

Untersuchungen
zu genetisch determinierten Polymorphismen
von Komplementkomponenten
bei Maus und Meerschweinchen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin
vorgelegt

von Martin Krönke
aus Marburg

Mainz 1978

1979

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

UNTERSUCHUNGEN ZU GENETISCH DETERMINIERTEN POLYMORPHISMEN
VON KOMPLEMENTKOMPONENTEN BEI MAUS UND MEERSCHWEINCHEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin

vorgelegt



von Martin Krönke
aus Marburg

Mainz 1978



Dekan:

Prof. Dr. H. Leithoff

1. Gutachter:

Prof. Dr. D. Bitter-Suermann

2. Gutachter:

Prof. Dr. U. Hadding

3. Gutachter:

Prof. Dr. Ch. Rittner

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.79

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. <u>EINLEITUNG</u>	1
1. Genetisch determinierter Polymorphismus	1
2. Proteinpolymorphismen in der Elektrophorese	3
3. Das Komplementsystem	7
4. Polymorphismen und Defekte im Komplementsystem	11
5. Das Histokompatibilitätssystem	12
B. <u>PROBLEMSTELLUNG</u>	13
C. <u>MATERIAL UND METHODEN</u>	14
1. Lösungen	14
2. Meerschweinchen	15
3. Mäuse	15
4. Serum- und Plasmaproben	16
5. Konversion des Faktor B in seine physiologischen Spaltprodukte	16
6. Antiseren	17
7. Immunelektrophorese	17
8. Rocket-Immunelektrophorese	18
9. Agarosehochspannungselektrophorese	18
10. Unspezifische Fixation	19
11. Immunfixation	19
12. Modifikationen	20
13. GPLA-Typisierung	21
D. <u>ERGEBNISSE</u>	21
1. Elektrophoretische Untersuchungen	21
1.1 Maus C3	21
1.2 Maus Faktor B	23
1.3 Meerschweinchen C3	25
1.4 Meerschweinchen Faktor B	27
1.5 Meerschweinchen C4	33
1.6 Meerschweinchen C4-Defekt	38

	Seite
2. Kopplungsstudien	41
2.1 Kopplung von Bf und C4 beim Meerschweinchen	41
2.2 Kopplung des Faktor B mit dem C4-Defekt des Meerschweinchens	42
2.3 Bf- und C4-Genotypen in Inzuchtstämmen	42
2.4 Kopplung von Bf und C4 mit dem GPLA-System	45
2.5 Crossing-over Familien	47
E. <u>DISKUSSION</u>	51
1. Die elektrophoretischen Erscheinungsformen der untersuchten Komplementkomponenten	51
2. Der C4-Defekt des Meerschweinchens	55
3. Kopplungsungleichgewichte von Bf- und C4-Haplotypen	56
4. Die Position der Loci Bf und C4 im GPLA-System	57
5. Die Rolle von Komplementkomponenten bei zellulären Immunmechanismen	62
F. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	64
G. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	66

Abkürzungen

C	= Komplement
C4D	= C4-Defekt
EDTA	= Äthylendiamintetraacetat-Tetranatriumsalz
GPLA	= Guinea Pig Leucocyte Antigens
H-2	= Histocompatibility-2
HLA	= Human Leucocyte Antigens
Ia-Antigene	= I region associated Antigene
MHC	= Major Histocompatibility Complex
Ms	= Meerschweinchen
Tf	= Transferrin

A. EINLEITUNG

1. Genetisch determinierter Polymorphismus

Im menschlichen und tierischen Organismus wird eine sehr große Anzahl verschiedener Enzyme und anderer Proteine synthetisiert. Es ist bekannt, daß die auch als Primärstruktur bezeichnete Aminosäuresequenz ihrer Polypeptidketten von der DNA eines einzelnen Gens kodiert wird. Es muß daher in der genetischen Anlage eines jeden Individuums eine große Menge sogenannter Strukturgene geben. Darüberhinaus kann für jedes Gen als Resultat von Mutationen eine Serie von verschiedenen Allelen existieren, die jeweils eine andere strukturelle Version der Polypeptidkette determinieren. In welchem Ausmaß sich einzelne Individuen einer Population in ihrer Enzym- und Proteinstruktur unterscheiden, hängt ab von der Zahl der verschiedenen Allele, die für ein Gen existieren und von der entsprechenden Frequenz ihres Auftretens.

Von einem genetisch determinierten Polymorphismus spricht man, wenn mindestens zwei Allele eines Strukturgens vorhanden sind und die Frequenz des am häufigsten auftretenden Allels kleiner als 99 % ist. Das bedeutet, daß mindestens 2 % der Individuen einer Population an diesem Locus heterozygot sind und die Heterozygotenhäufigkeit nicht als Ausdruck spontaner Mutationen erklärt werden kann. In vielen Fällen ist die Heterozygotenhäufigkeit jedoch viel größer.

Der genetisch determinierte Polymorphismus ist ein recht gewöhnliches Phänomen. Aufgrund elektrophoretischer Untersuchungen schätzt man, daß beim Menschen mindestens 30 % der Loci, die Enzyme kodieren, polymorph sind (55). Angesichts des weitverbreiteten Auftretens von Polymorphismen entstand eine Kontroverse über deren evolutionären Ursprung. Die eine Seite betont die Wichtigkeit der natürlichen Selektion, während sich die andere auf den zufallsbedingten genetischen Fluß beruft. (Zur Übersicht siehe Referenz 66.)

Die "klassische" Theorie führt die Häufigkeitsverteilung von Allelen primär auf die natürliche Auslese zurück. Die meisten Mutationen seien

nachteilig also selektionsnegativ, da eine zufällige Veränderung in der komplexen Struktur eines Proteins gewöhnlich dessen Funktion verschlechtert. Die Mehrzahl der mutanten Allele würde deshalb unter dem Selektionsdruck nur niedrige Frequenzen erreichen. Gelegentlich seien Mutationen jedoch vorteilhaft, selektionspositiv. Durch solche Mutationen entstandene Allele tendierten dazu, häufiger zu werden und weniger günstige Allele zu verdrängen. Die Selektion könne auch nur in der Vergangenheit zur Polymorphismusentstehung beigetragen haben und heute aufgrund einer Veränderung des die Population umgebenden Milieus nicht mehr wirksam sein. Da sich Allelfrequenzen nur sehr langsam über mehrere Generationen ändern können, bliebe der Polymorphismus existent, obwohl er dem Selektionsdruck nicht mehr ausgesetzt ist.

Eine alternative Erklärung bieten die Verfechter der neutralen Mutationshypothese an: Allele, die Proteinpolyorphismen determinieren, wie sie in natürlicher Population beobachtet werden, seien selektionsneutral und ihre Frequenzen und Verteilungen Folge des genetischen Flusses. Solche neutralen Allele würden in den meisten Fällen ein paar Generationen nach ihrem Auftreten wieder verschwinden. Einige würden aber zufällig persistieren, höhere Frequenzen erreichen und so zum Polymorphismus führen. Die Hypothese basiert auf der Tatsache, daß man beim Vergleich homologer funktionell so wichtiger Proteine wie etwa des Cytochrom C, feststellen kann, daß die Aminosäuresequenz der "aktiven Gruppen" von homologen Proteinen verschiedener Spezies ein Höchstmaß an Übereinstimmung aufweisen (65). Aufgrund dieser Konstanz der "aktiven Gruppen" nimmt man an, daß die Evolution der Polypeptidketten eines Enzyms entscheidend von der Größe der aktiven Gruppen abhängig war: Je größer die aktive Gruppe in einer Polypeptidkette ist, desto weniger Aminosäureaustausche wurden im Verlauf der Evolution in der ganzen Kette zugelassen. Träger von Mutationen an solchen wichtigen Abschnitten eines Proteins wurden offenbar stets eliminiert. Es kann daher angenommen werden, daß Mutationen, die dennoch zu Aminosäureaustauschen führen, funktionell neutrale Mutationen darstellen. Solche Mutationen können für die Evolution nicht von wesentlicher Bedeutung gewesen sein. Ebenso sind natürlich solche Mutationen evolu-

tionär neutral, die die wesentlichen Eigenschaften der Struktur, der Substrat- und Koenzymspezifität des betreffenden Proteins grundsätzlich belassen (65).

Die Mutation kann nach dieser Theorie erst dann zu einem wirksamen Faktor in der Evolution werden, wenn Gene zur Verfügung stehen, die dem Selektionsdruck nicht unmittelbar ausgesetzt sind. Solche Gene können z.B. durch Genduplikation entstehen. Mutationen (Basensubstitutionen, Deletionen, Insertionen) an den Genduplikaten beeinträchtigen nicht die essentiellen Funktionen des betroffenen Organismus. Aus den ursprünglich redundanten Genen können so Gene für neuartige Funktionen entstehen.

Da es für jede dieser beiden Hypothesen Beispiele gibt, geht es nicht darum zu entscheiden, ob alle Polymorphismen durch neutrale Mutationen entstanden sind, sondern wieviele. Ein Kriterium für das Vorliegen neutraler Mutationen stellt das Hardy-Weinberg Gesetz dar. Es besagt, daß beim Vorkommen zweier Allele mit den Häufigkeiten p und q in einer Bevölkerung diese ab der F_1 -Generation in den relativen Häufigkeiten $p^2 + 2pq + q^2$ auftreten sollten. Diese Verteilung sollte auch in allen folgenden Generationen konstant bleiben, wenn bei freier Partnerwahl (Panmixie) keiner der Genotypen einen Selektionsvorteil besitzt. Die Erfüllung des Hardy-Weinberg Gesetzes beweist jedoch noch nicht das Vorliegen funktionell gleichwertiger Allele, da man ein polymorphes Enzym nicht isoliert beurteilen sollte, sondern im gemeinsamen Aktionskreis mit anderen Enzymen und deren Varianten, die ihrerseits unter dem Selektionsdruck stehen. Aus diesem Grund gehört die Aufklärung der für die Entstehung von Polymorphismus verantwortlichen Selektionskräfte gegenwärtig zu den schwierigsten allgemeinen Problemen in der Evolutionsgenetik (56).

2. Proteinpolymorphismen in der Elektrophorese

Die Darstellung von Proteinpolymorphismen erfordert eine Technik, die auf der einen Seite sensibel genug sein muß, um einzelne Aminosäuren-

substitutionen differenzieren zu können, andererseits nicht zu aufwendig sein darf, da für die Ermittlung von Allelfrequenzen stets eine große Anzahl Individuen einer Population untersucht werden muß. Die Elektrophorese in vielfältigen technischen und methodischen Variationen wird diesen Anforderungen am ehesten gerecht und ist bei der Suche nach Proteinpolymorphismen die Methode der Wahl.

Die mit der Elektrophorese gewonnenen Angaben von Allelfrequenzen sind jedoch unvermeidlich Unterschätzungen der wahren Werte, wie aus den nachfolgenden Ausführungen ersichtlich wird.

1. Nicht alle Punktmutationen, die eine einzelne Base betreffen, führen zu einer Aminosäuresubstitution. Der genetische Code ist degeneriert und die Mehrzahl der Aminosäuren wird durch zwei verschiedene Nukleotid-Tripletts repräsentiert, einige sogar durch vier oder sechs. Infolgedessen werden einige Basenaustausche zwar zu einem neuen Triplet, nicht aber zu einer neuen Aminosäuresequenz führen, wenn das neue Triplet dieselbe Aminosäure kodiert wie das Originaltriplett. Solche Mutationen nennt man synonym.
2. Von Punktmutationen, die zu einer Aminosäuresubstitution führen, läßt sich nur der Teil mit der Elektrophorese nachweisen, der eine Änderung der Nettoüberschußladung des Proteins herbeiführt. Theoretisch weist nur ungefähr ein Drittel aller Proteinvarianten mit einer einzigen Aminosäuresubstitution eine veränderte elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit auf.
3. Sind Varianten elektrophoretisch nicht zu unterscheiden, werden sie einem Allel zugeordnet. Da aber zwei völlig verschiedene Aminosäuresubstitutionen die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit eines Proteins im gleichen Maße herauf- bzw. herabsetzen können, sind Angaben über Allelzahlen eines Locus immer Minimalwerte.

Andererseits wäre es aber falsch anzunehmen, daß alle Molekülvariationen das Produkt von Mutationen sind. Die verschiedenen Ursachen für das Auftreten multipler Formen von Enzymen, wie sie sich in der Elektrophorese darstellen, lassen sich in drei Kategorien einteilen:

- 1) Multiple Genloci
- 2) Multiple Allele an einem Locus und
- 3) Sekundäre oder postsynthetische Modifikationen.

Zu 1: Multiple Loci

Hier gibt es infolge von Genduplikationen für ein Enzym mehrere Loci, deren Gene funktionell verwandte Varianten des Enzyms kodieren. Handelt es sich um eine regional begrenzte Duplikation wie z.B. nach einem ungleichen Crossing-over von homologen Chromosomen in der Meiose, so liegen die separaten Loci eng gekoppelt auf dem gleichen Chromosom und werden als Einheit vererbt, wie z.B. die Loci der β - und α -Ketten des Hämoglobins (84). Nach Polyploidisierung, bei der das gesamte Genom vervielfacht wird, sind die Genduplikate auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert und segregieren daher unabhängig voneinander, wie z.B. die Loci der α - und β -Kette des Hämoglobins (61). Aus Genduplikationen sind im Verlauf der Evolution aber nicht nur neue Gene entstanden. Im Genom können vielmehr auch Genduplikate nachgewiesen werden, die einander völlig homolog sind, wie z.B. die Loci der r-RNA (91).

Zu 2: Multiple Allelie

Während beim Vorliegen mehrerer separater Loci die Aminosäuresequenzen der Polypeptidketten von Fall zu Fall verschieden weit differieren, unterscheiden sich Polypeptidprodukte von Allelen eines einzigen Locus meistens nur durch einzelne Aminosäuresubstitutionen. Allgemein weisen Isoenzyme, determiniert durch multiple Loci, ein größeres Ausmaß von Moleküldifferenzen auf als durch multiple Allelie entstandene Proteinpolymorphismen. Die beiden genetischen Entstehungsmechanismen können außerdem dadurch unterschieden werden, daß bei multipler Allelie die einzelnen Molekülformen interindividuell auftreten, während der komplette Satz von Isoenzymen multipler Genloci bei jedem Mitglied einer Population vorhanden sein muß.

Zu 3: Sekundäre oder postsynthetische Modifikationen

Multiple Allelie und multiple Genloci bilden zwar die genetische Basis für die verschiedenen Variationen eines Moleküls, die Komplexität vieler Isoenzymssysteme kann aber damit allein nicht vollständig erklärt werden. Es scheint, daß sekundäre Modifikationen von Proteinstrukturen nach der Synthese ihrer Polypeptidketten an den Ribosomen eine weitere wichtige Ursache für die multiplen Erscheinungsformen einzelner Proteine

sind. Obwohl die Natur dieser strukturellen Modifikation im Einzelfall meistens nicht genau bekannt ist, können doch einige allgemeine Angaben gemacht werden. Z.B. könnten die Amidgruppen von Glutamin- oder Asparaginresten entfernt werden. Die negative Nettoüberschußladung des Proteins würde sich erhöhen und damit die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit zur Anode. Andere mögliche strukturelle Modifikationen sind Azetylierung, Oxidation von Sulfhydrylgruppen, Addition von Phosphat- oder Kohlenhydratgruppen, Spaltung eines Teils der Polypeptidkette durch proteolytische Enzyme mit dem Verlust einiger Aminosäuren usw. Wenn sich solche Vorgänge nur an einem Teil der Proteinmoleküle abspielen und dann eventuell noch in unterschiedlicher Weise, kann eine ganze Gruppe vielfältiger Molekülformen aus einem Protein entstehen.

Es ist weiterhin denkbar, daß sich Proteine trotz identischer Primärstruktur ihrer Polypeptidketten in ihrer dreidimensionalen Tertiär- oder Quartärstruktur unterscheiden können, da bei einer vorgegebenen Aminosäuresequenz zwei oder mehrere relativ stabile Konfigurationen möglich sind. Da bei einer Konfigurationsänderung einer Polypeptidkette einzelne geladene und ungeladene Gruppierungen exponiert oder verborgen werden können, ist damit die Möglichkeit für Änderungen einzelner Eigenschaften wie der elektrophoretischen Beweglichkeit gegeben.

In bestimmten Fällen schließlich können Proteinmoleküle, wie z.B. das Haptoglobin (94) auch aggregieren oder polymerisieren, so daß Moleküle mit höherem Molekulargewicht entstehen und elektrophoretisch getrennt werden können.

Obwohl diese drei verschiedenen Ursachen für das Auftreten multipler Formen von Enzymen separat betrachtet wurden, ist für jeden Proteinpolymorphismus auch eine Kombination denkbar. So gibt es für die Phosphoglukomutase (PGM) drei distinkte Loci, für die jeweils mehrere Allele existieren (95). Zusätzlich findet man abhängig vom Durchschnittsalter der die PGM synthetisierenden Zellpopulationen eine Veränderung des Enzymbandenmusters (86).

3. Das Komplementsystem

Genetisch determinierte Proteinpolymorphismen treten im Organismus ubiquitär auf. Neben den Serumproteinen sind zellständige und membran-gebundene Proteine gleichermaßen betroffen. Alper und Propp entdeckten 1968 zum erstenmal einen Polymorphismus einer Komplementkomponente (3). Diese Entdeckung zeigte, daß auch die Faktoren des Komplementsystems als physiologische Serumproteine den gleichen Gesetzmäßigkeiten der Polymorphismusentstehung unterliegen.

Komplement ist die summarische Bezeichnung für ein multifaktorielles Proteinsystem des Warmblüterorganismus. Die biologischen Leistungen dieses Systems lassen sich mit den Begriffen Entzündungsvermittlung und Infektabwehr umschreiben. Darüberhinaus besteht ein vielschichtiges Zusammenspiel mit Antikörpern, Kininen, Enzymen der Blutgerinnung und der Fibrinolyse sowie zellulären Reaktionspartnern wie den Makrophagen, Granulocyten, Mastzellen, B-Lymphocyten und Thrombozyten. Mit dieser synoptischen Betrachtungsweise läßt sich sagen: Komplement gewährleistet im Verein mit vielen anderen Systemen die Reaktionsfähigkeit des Makroorganismus im Sinne der Erhaltung von Integrität und Individualität.

Mit modernen proteinchemischen Methoden ist es gelungen, die einzelnen Komponenten des Komplements (C) rein darzustellen und zu charakterisieren. C besteht aus neun Komponenten C1 - C9, wobei C1 ein Makromolekül ist, das aus den drei Untereinheiten C1q, C1r und C1s besteht. So kommt es, daß es zwar elf Komplementproteine aber nur neun Komponenten gibt. Bis auf C4, C2 und C3 bekam jede Komponente die Ziffer, die ihrer Position in der Reaktionsfolge entspricht: C1 - C4 - C2 - C3 - C5 - C6 - C7 - C8 - C9. Zum Komplementsystem im weiteren Sinne gehört neben den drei gegen C1, C3 und C6 gerichteten Inaktivatoren das zur C-Aktivierung führende Properdinsystem. Es handelt sich bei letzterem um das Properdin (P) im engeren Sinne und um die Faktoren B und D sowie C3b (siehe Seite 9). Die Notwendigkeit und Existenz von Initialfaktoren (IF) werden noch kontrovers beurteilt (36, 37, 111).

Die Aktivierung des Komplementsystems führt zu Leistungen und Wirkungen, die direkt oder indirekt von einer oder mehreren der neun Komponenten ausgehen. Zwei Hauptwege der Komplementaktivierung sind bekannt, die von jeweils unterschiedlichen Strukturen ausgelöst werden. Der erste läuft über C1, C4 und C2, während der zweite mit Hilfe des Properdinsystems unter Umgehung der eben genannten Komponenten zu einer C3-Aktivierung führt. Der erste Weg ist am längsten bekannt und wird mittlerweile als der klassische bezeichnet, während für den alternativen Weg der Komplementaktivierung auch die Begriffe "alternative pathway" oder "Properdinsystem" benutzt werden (49, 88).

Der klassische Weg

Bilden sich im Organismus Antigen-Antikörperkomplexe, z.B. mit Antikörpern beladene Erythrozyten (EA) unter Beteiligung von IgG oder IgM, so tritt durch die spezifische Antigen-Antikörper Reaktion eine Konformationsänderung des Fc-Stückes des Antikörpers ein. Dadurch entfaltete Strukturen des Fc-Stückes ermöglichen der Untereinheit C1q, sich an den Komplex anzulagern. Dabei wird die an der Zelle im Verband des C1-Makromoleküls gebundene Untereinheit C1s durch C1r zu C1s (EAC1) aktiviert und spaltet C4 in C4a und C4b. (Wird eine Komponente gespalten, so erhalten die Bruchstücke kleine Buchstaben als Zusatz; ein Strich über einer Komponenten symbolisiert enzymatische Aktivität). Das C4b Bruchstück bindet sich an die Zelle, es entsteht das Intermediärprodukt EAC14b. In analoger Weise wird C2 gespalten. Das größere Bruchstück, hier C2a, bindet sich und bildet dadurch ein neues Enzym, EAC142, das auch als C3-Konvertase bezeichnet wird. Es reagiert enzymatisch mit C3 und liefert die Spaltprodukte C3a und C3b. Das größere Bruchstück C3b kann sich an Membranen binden und verleiht diesen völlig neue Eigenschaften. Sie werden "klebrig" und können sich an C3-Rezeptoren auf normalen humanen Erythrozyten oder Leukozyten verschiedener Spezies anlagern. C3b ermöglicht damit also eine Zell-Zellinteraktion. Da die C3b Beladung meist im Rahmen einer immunologischen Reaktion, nämlich der Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes mit nachfolgender Komplementaktivierung erfolgt, wurde der Name Immunadhärenz geprägt (89). Lagert sich das C3b an

körperfremde Membranen an, so wird die Phagozytose dieses Fremdmaterials erleichtert oder überhaupt erst ermöglicht. Diesen Vorgang nennt man Opsonisierung. Findet sich für frischenstandenes C3b kein passender Bindungsort, so verfällt diese Bindungsfähigkeit sehr rasch (31). Im Falle der Immnhämolyse dient der Erythrozyt als Akzeptor. Es entsteht ein EAC1423 Intermediärkomplex, der C5 enzymatisch in C5a und C5b spaltet. Das kleinere Bruchstück C5a geht wie C3a in die flüssige Phase. Die beiden Peptide C3a und C5a werden auch als Anaphylatoxine bezeichnet. Sie sind unter anderem fähig, aus Mastzellen Histamin freizusetzen, erhöhen die Vasopermeabilität und C5a wirkt außerdem leukotaktisch (121).

Bis zu diesem Stadium stellt die Komplementsequenz eine Kette von enzymatischen Reaktionen dar. Für die Aktivierung der nachfolgenden Komponenten C6 - C9 ließen sich bisher keine enzymatischen Reaktionen zeigen. Diese Faktoren bilden großmolekulare Komplexe mit hoher Membranaffinität (71). Durch deren Einwirkung entsteht in der betroffenen Zellmembran eine Störung, die in noch unbekannter Weise zum Zusammenbruch der Membranfunktion und damit zur Lyse der Zelle als Endstadium führt (79).

Der alternative Weg

Wie bereits erwähnt hat der Organismus über das Properdinsystem die Möglichkeit, auch in den Phasen, wo noch keine oder zu wenig spezifisch reagierende Antikörper vorhanden sind, die biologischen Leistungen des Komplementsystems zu nutzen. In der Präimmunphase gilt also die ursprünglich angenommene strenge Kopplung zwischen Antigen-Antikörper-Reaktion und Komplementwirkung nicht mehr. Bei der Benutzung des alternativen Weges kann Komplement als selbständiges Abwehrsystem mit zytotoxischen Eigenschaften und großer Bedeutung für Entzündungsvorgänge in Erscheinung treten. Der alternative Weg wird induziert durch verschiedene Substanzen wie z.B. bestimmte Dextrane, Inulin, Agar, Zymosan - ein unlöslicher Bestandteil aus Hefezellwänden, Lipopolysacchariden, die als Endotoxine bekannt sind und aus Zellwänden gramnegativer Bakterien stammen, sowie Pneumokokken Polysaccharid SIII, Levan, Streptokokken A Zellwandprodukt und Actinomyces viscosus aus der Familie der

Aktinomyceten (16, 109). Dabei erscheint es bemerkenswert und im Hinblick auf die Funktion bedeutungsvoll, daß die überwiegende Mehrzahl dieser Substanzen mikrobiellen Ursprungs ist. Für die Wirkungsweise dieser Induktoren gibt es zwei divergierende Ansichten:

1) Postulierte Initialfaktoren sind in der Lage - unter Mithilfe der Faktoren B und D -, auf die von den verschiedenen Induktoren dargebotenen Strukturen so zu reagieren, daß kleine Mengen von C3 aktiviert werden. Hierbei anfallendes, kurzfristig freies und dann an den Induktor (Ind) gebundenes C3b liefert einen Rezeptor für den Faktor B. Mit C3b komplexiertes B kann nun durch $\bar{D}$ ($\bar{D}$ ist möglicherweise ein Spaltprodukt des Prothrombin (27).) in Ba und Bb gespalten werden. Es entsteht ein C3b $\bar{B}$ -Enzym, welches durch Properdin stabilisiert werden kann und im Sinne einer positiven Rückkopplungsreaktion wiederum C3 umzusetzen vermag (87). Diese Reaktion ist das Kernstück des Properdinsystems und wird auch als "C3-feed-back-Mechanismus" bezeichnet.

2) Die alternative Ansicht bestreitet die Existenz und Notwendigkeit von Initialfaktoren und sieht die Rolle der Induktoren darin, ubiquitär und permanent anfallendes C3b besonders gut und effizient binden zu können und es vor allem dem physiologischen Gegenregulationssystem der C3b Inaktivatoren zu entziehen. Damit entsteht dann mit B und D sowie Properdin ein induktorgebundenes C3bBP-Enzym wie auch unter 1) geschildert (36, 37). Dieses Enzym ist jetzt außerdem in der Lage, C5 - C9 zu aktivieren bishin zur lytischen Wirksamkeit des Komplexes (80).

Eine besondere Möglichkeit der B-Aktivierung bietet der Cobragiftfaktor (CVF), der als funktionelles C3b-Analog diskutiert wird (11). CVF vermag in Gegenwart von Mg^{++} B so zu binden, daß es für $\bar{D}$ angreifbar wird. Das gegenüber C3 und C5 (18) aktive Enzym CVF $\bar{B}$ ist sehr stabil (15, 122) und wird daher zur Dekomplementierung von Experimentaltieren ebenso eingesetzt wie zur Gewinnung von physiologischen C3- und C5-Spaltprodukten (83).

4. Polymorphismen und Defekte im Komplementsystem

Defekte einzelner Komplementkomponenten bei Versuchstieren und beim Menschen sind wissenschaftlich sehr aufschlußreich, da sie einerseits helfen, Funktion, Reaktionsfolge und Regulationsmechanismen im Komplementsystem aufzudecken. Andererseits helfen sie auch, die von den betreffenden Komponenten ausgehenden biologischen Wirkungen in vitro und in vivo näher zu charakterisieren. Polymorphismen sind dagegen funktionell indifferent (3) und dienen vornehmlich in populationsgenetischen Studien der Charakterisierung menschlicher Rassen und verwandtschaftlicher Beziehungen zwischen ethnischen Gruppen (1, 6). Das Interesse an Polymorphismen nahm jedoch zu, als Allen 1974 entdeckte, daß der Polymorphismus des Faktor B genetisch gekoppelt ist mit dem humanen Haupthistinkompatibilitätssystem: Major Histocompatibility Complex (MHC) (2). Die Eigenschaft, als genetischer Marker zur Genkartierung beitragen zu können, prädestiniert den Polymorphismus mehr als die selteneren genetischen Defekte für Kopplungsstudien. Seit Allens Entdeckung wurde forciert nach Polymorphismen von Komplementkomponenten in verschiedenen Spezies gesucht, um die Kopplungsbeziehungen der einzelnen Komponenten mit dem jeweiligen MHC studieren zu können. So wurden bis zum Beginn dieser Arbeit noch die Kopplungsbeziehungen einiger anderer Komponenten erforscht. Man fand, daß neben dem Faktor B auch der C2-Defekt mit dem humanen MHC, dem HLA-System, assoziiert ist (42). Dagegen konnten weder eine Kopplung des C3-Polymorphismus noch des C3-Defekts mit dem HLA festgestellt werden (8, 9). Beim Rhesusaffen wurden insofern gleiche Verhältnisse vorgefunden, als auch hier der Faktor B-Polymorphismus mit dessen MHC gekoppelt ist und der C3-Polymorphismus nicht (126).

Obwohl bei der Maus seit 1973 bekannt ist, daß deren MHC (H-2 Komplex) die Komplementaktivität beeinflußt (30), war es bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht gelungen, ein Strukturgen einer Komplementkomponente im H-2 Komplex zu lokalisieren. Die C5-Defizienz der Maus ist dagegen definitiv nicht mit dem H-2 Komplex gekoppelt (59, 90).

5. Das Histokompatibilitätssystem

Die Kopplung von Komplementkomponenten mit dem MHC in verschiedenen Spezies ist deshalb so interessant, weil dieses System zahlreiche zelluläre Immunmechanismen kontrolliert (43, 64). Der MHC ist ein multigenes System, das u.a. Struktur und Expression einer Reihe von Zelloberflächenproteinen determiniert, von denen einige ursprünglich als Transplantationsantigene erkannt wurden (20, 68).

Der MHC der Maus, der H-2 Komplex, ist der strukturell und funktionell beststudierte MHC eines Säugetiers. Der H-2 Komplex besteht aus den vier Regionen K, D, I und S. Die I Region ist weiter unterteilt in mindestens fünf Subregionen. Die Genprodukte der H-2K und H-2D Regionen sind Zelloberflächenproteine, die als Transplantationsantigene bezeichnet werden (70). Auch Genprodukte der I Region, die sogenannten Ia- (I region associated) Antigene sind Zelloberflächenproteine. Sie unterscheiden sich von den H-2K und H-2D Genprodukten in Molekulargewicht und Gewebsverteilung (116). Diesen serologisch definierten Genprodukten steht eine Reihe von immunologischen Phänomenen gegenüber, die unter der Kontrolle des H-2 Komplexes stehen. So spielen die Zelloberflächenproteine eine fundamentale Rolle bei der Transplantatabstoßung (70), in der gemischten Lymphozytenkultur (Mixed Lymphocyte Culture-MLC (78)) und in der Transplantat-gegen-Wirt Reaktion (Graft versus Host Reaction-GvHR (50)). Außerdem steht die T- und B-Zell Interaktion bei der spezifischen Immunantwort auf bestimmte thymus-abhängige Antigene unter der Kontrolle des H-2 Komplexes (Ir-Gene) (116). Zusammenfassend kann man sagen: Die H-2K, H-2D und vor allem die H-2I Regionen kontrollieren Immunreaktionen auf der T-Zell Ebene.

Äquivalente Regionen und Funktionen weisen alle MHC von Säugetieren auf (13), insbesondere auch das HLA-System des Menschen. Ausführliche genetische, serologische und physikochemische Studien am MHC des Meerschweinchens, dem GPLA-System, zeigten, daß dessen B und S Regionen Genprodukte determinieren, die den H-2K und H-2D bzw. den HLA-A und HLA-B Genprodukten in Molekulargewicht und Gewebsverteilung entspre-

chen (45, 112, 123). Auch die GPLA-I Region scheint der H-2I Region der Maus äquivalent zu sein (46, 47, 113, 114). Der H-2 Komplex der Maus enthält jedoch darüberhinaus eine weitere Region, H-2S, deren Funktion lange Zeit unbekannt war. Démant et al. konnten schließlich 1973 nachweisen, daß die S Region die Komplementaktivität beeinflusst (30). Vor diesem Hintergrund gewannen die Befunde über die Kopplung von Komplementkomponenten mit dem MHC bei Mensch und Rhesusaffen ihre besondere Akzentuierung.

B. PROBLEMSTELLUNG

Es war bekannt, daß beim Menschen die Loci für die Komplementkomponenten C2 und Faktor B mit dem Histokompatibilitätssystem assoziiert sind (2, 42). Analoge Befunde lagen für den Faktor B des Rhesusaffen vor (126). Diese Faktoren besitzen eine Schlüsselfunktion bei der C3-Spaltung. Bei der Spezies Maus fand man, daß der H-2 Komplex die Komplementaktivität beeinflusst (30).

Es stellte sich daher für die immunologische Forschung die Frage, ob die Loci der zur C3-Spaltung befähigten Komponenten des klassischen und alternativen Weges der Komplementaktivierung nicht nur bei Mensch und Rhesusaffe, sondern bei allen Säugetieren im MHC genetisch verankert sind. Die Beibehaltung der Assoziation dieser Gene mit dem MHC über eine lange Periode der Säugetierevolution könnte nämlich ein Hinweis dafür sein, daß der genetischen Kopplung auch eine funktionelle Bedeutung zukommt.

Ziel dieser Arbeit war es, bei den Spezies Maus und Meerschweinchen die Kopplungsbeziehungen einiger Komplementkomponenten zu bestimmen.

Die Aufgabenstellung gliederte sich in zwei Abschnitte: Zunächst sollten C3 und der Faktor B der Maus sowie C4, C3 und der Faktor B des Meerschweinchens elektrophoretisch untersucht werden. Sollte

dabei ein genetisch determinierter Polymorphismus einer Komponente entdeckt werden, so sollte dann die Kopplungsbeziehung des betreffenden Strukturgens mit dem H-2 Komplex bzw. mit dem GLA-System geklärt werden.

Durch die Wahl der Spezies sollte außerdem die Grundlage für Experimentmodelle geschaffen werden, welche die Suche nach einem funktionellen Korrelat zu der genetischen Kopplung von Komplementkomponenten mit dem MHC begünstigen.

C. MATERIAL UND METHODEN

1. Lösungen

a) Brückenpuffer

25,14 g	5,5 Diäthylbarbitursäure Natriumsalz	(Merck, Darmstadt)
3,90 g	5,5 Diäthylbarbitursäure	(Merck, Darmstadt)
1,10 g	Calciumlactat	(Merck, Darmstadt)

ad 1000 ml aqua dest., pH 8,6; $c_{Ca^{++}} = 0,0009 \text{ M}$

b) Gelpuffer 1

4,74 g	5,5 Diäthylbarbitursäure Natriumsalz	(Merck, Darmstadt)
0,68 g	5,5 Diäthylbarbitursäure	(Merck, Darmstadt)
0,277 g	Calciumlactat	(Merck, Darmstadt)

ad 1000 ml aqua dest., pH 8,6; $c_{Ca^{++}} = 0,0009 \text{ M}$

c) Gelpuffer 2

4,74 g	5,5 Diäthylbarbitursäure Natriumsalz	(Merck, Darmstadt)
0,68 g	5,5 Diäthylbarbitursäure	(Merck, Darmstadt)
0,277 g	Calciumlactat	(Merck, Darmstadt)
20,0 g	Polyäthylenglycol 4000	(Merck, Darmstadt)

ad 1000 ml aqua dest., pH 8,6; $c_{Ca^{++}} = 0,0009 \text{ M}$

d) Coomassie-brillant-blue Färbelösung

5,0 g	Coomassie-brillant-blue R250	(Serva, Heidelberg)
450,0 ml	Äthanol 96 %	(Merck, Darmstadt)
100,0 ml	Eisessig	(Merck, Darmstadt)
450,0 ml	aqua dest.	

e) Entfärbelösung

450,0 ml	Äthanol 96 %	(Merck, Darmstadt)
100,0 ml	Eisessig	(Merck, Darmstadt)
450,0 ml	aqua dest.	

f) Fixationslösung

500,0 ml	Methanol	(Merck, Darmstadt)
500,0 ml	aqua dest.	

2. Meerschweinchen

Männliche und weibliche nach dem Zufallsprinzip gezüchtete Auszucht-tiere, peruanische Wildmeerschweinchen sowie Meerschweinchen der In-zuchtstämme NIH 2, NIH 13, NIH C4D, Bio B, Bio C, Bio AC, Bio AD, Denmark, PCA, OM₃, BE, R9 wurden verwendet.

Die Zuchtpaare der Stämme NIH 2, NIH 13 und NIH C4D wurden von Dr. M. Frank, NIH, Bethesda, USA bezogen und im eigenen Tierstall weiter-gezüchtet. Nicht ingezüchtete Meerschweinchen wurden von lokalen Züch-tern gekauft und teilweise im eigenen Tierstall weiter gehalten. Serum- bzw. Plasmaproben von Ms der Stämme Bio B, Bio C, Bio AC, Bio AD, Denmark, PCA, OM₃, BE, R9 sowie von peruanischen Wildmeerschweinchen wurden von Dr. A.F. Geczy, Institut für Klinische Immunologie der Universität Bern, zur Verfügung gestellt.

3. Mäuse

Männliche und weibliche Mäuse der Inzuchtstämme B10.A, B10.A(4R), B10.(2R), B10.AKM, B10.D2, B10.HTT, B10.S(7R), DBA/1, AKR, AQR, ATL

und ATH stammten aus den am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Mainz gezüchteten und gehaltenen Kolonien. Tiere der Stämme Balb/c, CBA, C3H, C57B1/6, DBA/2, NZB, NMRI wurden von Gl. Bomholtgaard, Ry, Denmark gekauft, Tiere der Stämme ASW, B10.D2/oSn und B10.D2/nSn von The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA. Außerdem wurden noch acht gefangene Hausmäuse (Wildmäuse) untersucht.

4. Serum- und Plasmaproben

Meerschweinchen wurde Blut durch Herzpunktion entnommen. Für die Serumprobengewinnung wurden keine Antikoagulantien zugesetzt. Die Blutproben wurden eine Stunde bei Raumtemperatur aufbewahrt, dann abzentrifugiert. Das Serum wurde entweder sofort untersucht oder bei -70°C aufbewahrt und erst direkt vor der Untersuchung wieder aufgetaut. Für die Gewinnung von Plasma wurde den Blutproben EDTA (Merck, Darmstadt) in einer Endkonzentration von 0,01 M zugesetzt. Auch die nach Abzentrifugieren gewonnenen Plasmaproben wurden sofort untersucht oder bis zur Untersuchung bei -70°C aufbewahrt. (Die geringe Menge an EDTA in den Plasmaproben störte den Ca^{++} -Ionen Effekt bei der Elektrophorese nicht. Dem Zusatz von Ca^{++} -Ionen im Puffer kommt bei der Darstellung von C3 besondere Bedeutung zu: C3 bindet Ca^{++} -Ionen, wodurch eine Verlangsamung der Wanderungsgeschwindigkeit eintritt und eine klare Abgrenzung gegenüber den Transferrinbanden erzielt wird (75).)

Mäuse wurden aus dem Retroorbitalsinus geblutet. Die Gewinnung von Serum erfolgte wie beim Ms beschrieben.

5. Konversion des Faktor B in seine physiologischen Spaltprodukte

Neben dem nativen Faktor B Molekül wurde auch dessen größeres Spaltprodukt Bb untersucht. Die Spaltung (Konversion) des Faktor B in seine physiologischen Spaltprodukte, das größere Bb und das kleinere Ba, wurde durch Inkubation der Serumproben mit einem Induktor des alternativen Weges der Komplementaktivierung herbeigeführt. Dazu wurde frisches Serum oder bei -70°C aufbewahrtes Serum bei 37°C 30 Minuten lang mit 1 mg Zymosan (ICN Pharmaceuticals INC., Cleveland, USA) pro

ml Serum inkubiert. Durch Aktivierung des "alternative pathway" war der Faktor B danach vollständig in Bb und Ba konvertiert.

6. Antiseren

Monospezifische IgG-Präparate der Antiseren Anti-Meerschweinchen-C3, Anti-Meerschweinchen-B, Anti-Maus-C3 und Anti-Maus-B standen in den Laboratorien von Prof. Dr. D. Bitter-Suermann und Prof. Dr. U. Hadding, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Mainz, zur Verfügung. Die Immunisierung von Ziegen und Kaninchen erfolgte mit nach beschriebenen Reinigungsschritten hochgereinigten C3- bzw. B-Präparaten (14, 16, 17, 22, 51, 77).

Anti-Ms-C4

Meerschweinchen des C4-defekten Stammes, dessen Tiere aufgrund eines genetischen Defektes im Serum kein C4 aufweisen, wurden mit Serum von Ms des Stammes NIH 13 immunisiert. Dieser und der C4-defekte Stamm sind eng miteinander verwandt und identisch bezüglich ihres MHC-Antigenmusters (114). Das Serum wurde mit komplettem Freund's Adjuvans in die Fußsohle injiziert. Es erfolgten vier Booster mit subkutan injiziertem Serum in Abständen von zwei Wochen. Fünf Tage nach dem letzten Booster wurden die Ms entblutet. Eine Abtrennung der IgG-Fraktion von den restlichen Proteinen des Antiserums erfolgte nicht.

7. Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese wurde in 1 % Agarose mit Veronalpuffer für die Elektrophorese (Merck) pH 8,6 und 0,005 M EDTA auf Objektträgern durchgeführt (124). Es wurden jeweils 10 μ l Probe aufgetragen. Die Laufzeit bei 4⁰ C betrug 2 - 3 Stunden bei 8V/cm. Anschließend wurde das Antiserum eingefüllt und die Präzipitationslinien 24 - 48 Stunden entwickelt. Nach Elution nicht-präzipitierten Proteins (36 Stunden) mit 1 % NaCl, Wässern und Trocknen erfolgte die Färbung mit der Coomassie-brillant-blue Farblösung.

8. Rocket-Immunelektrophorese

Zur quantitativen Bestimmung der Meerschweinchen C4-Plasmakonzentration wurde die Rocket-Immunelektrophorese nach dem Prinzip von Laurell durchgeführt (76). Dazu wurde eine Glasplatte (100 x 100 x 2 mm) mit einem 1 % Agarosegel beschichtet, das monospezifisches Anti-Meerschweinchen-C4 in einer Konzentration von 1 % enthielt. In gestanzten Vertiefungen wurden jeweils 5 μ l unverdünnter Plasmaprobe eingefüllt. Die Elektrophorese wurde während 12 Stunden in einer Kammer (F. Behringwerke AG, Marburg) bei 2 V/cm und 15⁰ C durchgeführt. Die Elution nicht präzipitierten Proteins sowie Wässern, Trocknen und Färben erfolgte wie bei der Immunelektrophorese.

9. Agarosehochspannungselektrophorese

Die Agarosehochspannungselektrophorese wurde nach der von Alper (4) beschriebenen und Teisberg (119) modifizierten Methode durchgeführt. 0,6 g Agarose (Biomol, Ilvesheim) wurden in 60 ml Gelpuffer 1 oder 2 suspendiert und erhitzt. Die klare 1 %ige Agaroselösung wurde auf eine horizontal gelagerte, 20 x 20 x 0,2 cm große Glasplatte gegossen, so daß eine 1,5 mm dicke Gelschicht entstand. Für den Auftrag der Serumproben wurden ca. 16 Schlitz gestanzt. Dabei wurde das Ende eines 0,8 - 0,9 cm breiten Filterpapierstreifens (Whatman No 3) senkrecht in die Gelschicht gedrückt. Das durch das Gel befeuchtete Ende des Streifens wurde weggeschnitten und der nächste Schlitz in gleicher Weise gestanzt. Der Abstand der Schlitz zum kathodischen Rand der Platte betrug 4 cm, die Entfernung der beiden äußeren Schlitz zum seitlichen Rand 1 cm. Mit einer Mikropipette (Eppendorf) wurden jeweils 5 μ l Serum- bzw. Plasmaprobe in den Schlitz eingefüllt. Sofort nach dem Auftrag wurde mit der Elektrophorese begonnen. Die Platte wurde dazu auf den Kühlblock einer DESAGA Elektrophoresekammer (DE-Doppelkammer für Dünnschicht-isoelektrische Fokussierung, Desaga, Heidelberg) gelegt. Auf zwei gegenüberliegenden Seiten des Kühlblocks befanden sich zwei Puffertröge, die mit dem Brückenpuffer gefüllt wurden. Der Stromkontakt zwischen den Pufferkammern und dem Gel wurde mit zwei aufeinandergelegten, puffergetränkten Filterpapierbrücken

(Whatman No 3) hergestellt. Die Spannung wurde so gewählt, daß in der Mitte des Agarosegels eine Spannung von 20 V/cm herrschte. Dies wurde mit zwei Platinelektroden eines Voltmeters kontrolliert. Die Dauer der Elektrophorese richtete sich nach dem aufzutrennenden Protein. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine im Agarosegel auf zwei grundsätzlich verschiedene Arten fixiert.

10. Unspezifische Fixation

Hierbei werden alle im Gel befindlichen Proteine mit einer Methanol-lösung fixiert. Die Elektrophoreseplatten wurden eine Stunde lang in die Fixationslösung gelegt. Danach wurden die Platten an der Luft getrocknet und anschließend mit der Coomassie-brillant-blue Färbelösung gefärbt. Der nicht an Protein gebundene Farbstoff wurde mit der Entfärbelösung eluiert.

11. Immunfixation

Die Immunfixation erfolgte nach dem von Alper und Johnson beschriebenen Prinzip (4). Durch Überschichtung des Gels mit einem monospezifischen Antiserum präzipitieren nur die das entsprechende Antigen tragenden Proteine und werden so im Gel fixiert. Nach der Überschichtung des Gels vom Auftragspunkt bis zum anodischen Rand der Platte mit zwei Milliliter des Antiserums wurden die Elektrophoreseplatten drei Stunden lang in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Agaroseschicht gepreßt. Dazu wurden ein feuchtes sowie vier trockene Filterpapierblätter (Whatman No 3) auf die Geloberfläche gelegt. Zum Beschweren dienten eine Glasplatte und ein Gewicht von zwei Kilogramm. Nach zehn Minuten wurden die Filterpapierblätter entfernt. Die nicht fixierten Proteine wurden 36 Stunden lang mit physiologischer Kochsalzlösung eluiert. Trocknen, Färben und Entfärben erfolgte wie in 10. beschrieben.

12. Modifikationen

Die ~~Elektrophorese~~- und Fixationsbedingungen wurden im Einzelfall wie folgt modifiziert:

Für die Bestimmung von Maus und Meerschweinchen C3 betrug die Elektrophoresedauer drei Stunden. Die Kapazität des Brückenpuffers in den Puffertrögen reichte bei der angelegten Spannung nur für ca. zwei Stunden. Die Puffertröge mußten deshalb pro Lauf einmal gewechselt werden. Da die Serumkonzentration des C3 sehr hoch ist - 800 mg/ml (51, 77) -, konnte die unspezifische Fixation angewendet werden. Die C3-Bande erscheint unter diesen Bedingungen im Elektrophoresemuster zwischen dem Transferrin und dem Auftragspunkt. Die Immunfixation diente hier nur zur antigenetischen Identifizierung der C3-Bande. Bei der Darstellung des Faktor B sowie dessen Konversionsprodukts Bb genügte eine Elektrophoresedauer von zwei Stunden. Die unspezifische Fixation war wegen der geringen Serumkonzentration von 200 µg/ml (17) nicht möglich. Es gelangte ausschließlich die Immunfixation zur Anwendung. Hierbei wurde der Gelpuffer 2 verwendet, dem im Vergleich zum Gelpuffer 1 Polyäthylenglykol in einer Konzentration von 2 % zugesetzt wurde. Wasserlösliche Polymere wie das Polyäthylenglykol induzieren eine Präzipitation von löslichen Antigen-Antikörper Komplexen. So wird die Menge an spezifischen Präzipitaten erhöht (54). Die Intensität der Proteinbanden konnte dadurch gesteigert und der Verbrauch an Antiserum reduziert werden. Während die Auftrennung von Serum- und Plasmaproben im Fall von C3 und Faktor B zu gleichen Resultaten führte, gelang die Darstellung von C4 nur mit Plasmaproben. Der Einsatz von Serum erbrachte nur verwaschene, nicht interpretierbare Banden. Die Elektrophoresedauer betrug drei Stunden und es mußten wie bei der C3 Darstellung die Puffertröge einmal während des Laufs erneuert werden. Um das günstigste Antigen-Antikörperverhältnis für die Fixation zu erreichen, wurden die Plasmaproben in isotonischer NaCl-Lösung 1 : 3 verdünnt.

13. GPLA-Typisierung

Die Bestimmung der GPLA-Phänotypen wurde freundlicherweise von Dr. A.F. Geczy, Institut für Klinische Immunologie der Universität Bern, Schweiz durchgeführt. Dabei wurden im ^{51}Cr Freisetzungstest die GPLA-B und -Ia Spezifitäten auf Lymphozyten typisiert (45).

D. ERGEBNISSE

1. Elektrophoretische Untersuchungen

1.1 Maus C3

Die elektrophoretische Darstellung des C3 wird dadurch erleichtert, daß seine relativ hohe Serumkonzentration einen Nachweis ohne Anreicherungsverfahren und ohne spezifische Immunfixation erlaubt. Nach der unspezifischen Methanolfixation konnte bei über 200 Mäusen des Auszuchtstammes NMRI, acht eingefangenen Hausmäusen (Wildmäusen) sowie jeweils mehreren Tieren der in Material und Methoden aufgezählten Inzuchtstämme kein elektrophoretisch darstellbarer, genetisch determinierter Polymorphismus beobachtet werden. Bei allen untersuchten Serum- und Plasmaproben zeigte sich nur ein einziger Phänotyp (Abb. 1). Das C3 der Maus dominiert wie beim Meerschweinchen als kräftige Bande zwischen Auftragspunkt und Transferrin (Tf). Bei Alterung der Serumproben bei Raumtemperatur wurden die C3-Banden zunehmend schwächer bis zum völligen Verschwinden. Zur Identifikation der C3-Bande dienten ein hochgereinigtes Maus-C3-Präparat sowie die Immunfixation mit monospezifischen Anti-Maus-C3. Das gereinigte C3-Präparat nahm die gleiche elektrophoretische Position wie das native Serum-C3 ein, sowohl bei der Methanol- als auch bei der Immunfixation. Die letztere lieferte außerdem noch den Beweis für die antigenetische Identität der C3-Banden.

Maus C3

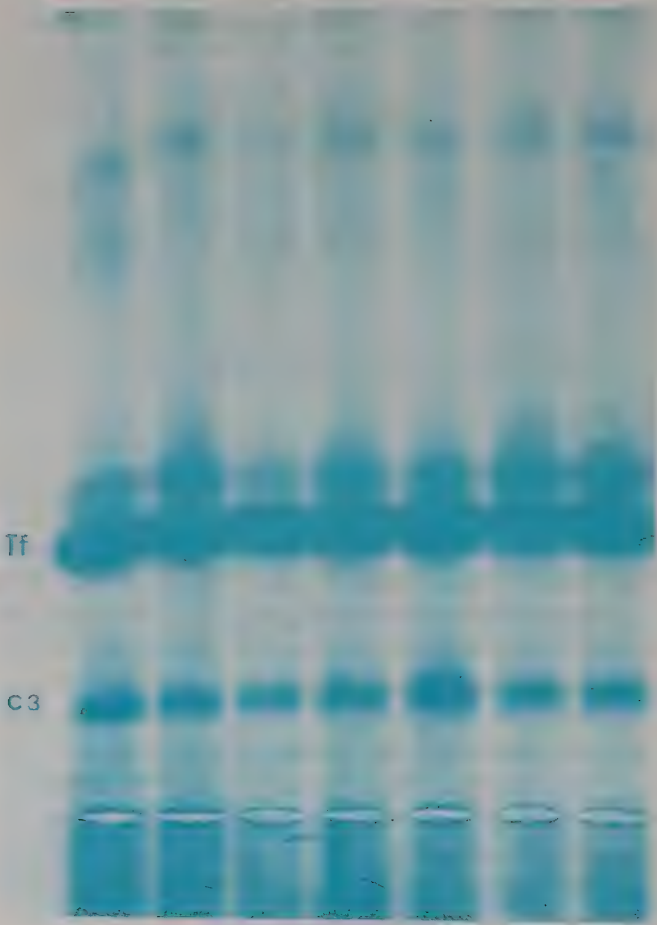


Abb. 1: Die C3-Bandenmuster der Maus, dargestellt aus frischen Serumproben des NMRI-Stammes in der Agarosehochspannungselektrophorese. Die Anode befindet sich oben. Die Uniformität der C3-Banden ist repräsentativ für alle untersuchten Serumproben.

1.2 Maus Faktor B

Nach der Immunfixation mit monospezifischem Anti-Maus B stellte sich bei allen untersuchten Serumproben der Faktor B dar als Komplex von einer stärkeren Hauptbande und mehreren schwächeren anodischen Minorbanden. Während die Hauptbande bei allen Proben konstant war, das heißt gleiche Position und Stärke aufwies, differierten die Minorbanden in Zahl und Stärke, nicht aber in ihrer elektrophoretischen Position. Je nach Probe konnten zwei bis fünf Minorbanden beobachtet werden (Abb. 2). Innerhalb der einzelnen Inzuchtstämme variierten die Serumproben der Mäuse in der gleichen Weise, so daß es sich hier nicht um einen genetisch determinierten Polymorphismus handelt. Für diese Heterogenität sind vielmehr postsynthetische Modifikationen verantwortlich, wie z.B. unterschiedlicher Metabolismus und Verbrauch des Faktor B bei der Blutgerinnung, bei Entzündungen und anderen pathologischen Prozessen. Es wurden keine Versuche unternommen, die genauere Natur dieser Modifikation abzuklären.

Das größere Spaltprodukt des Faktor B, B_b, ließ sich nur sehr schlecht darstellen, obwohl es antigenetisch vom Anti-Maus B erfaßt wurde. Soweit die Bandenmuster zu beurteilen waren, konnten auch bei den B_b-Fragmenten keine elektrophoretischen Wanderungsdifferenzen beobachtet werden.

Maus Faktor B



Abb. 2: Die Faktor B-Bandenmuster der Maus, dargestellt aus frischen Serumproben des NMRI-Stammes in der Agarosehochspannungselektrophorese mit nachfolgender Immunfixation mit monospezifischem Anti-Maus B. Die Anode befindet sich oben. Die Variabilität der schwächeren Minorbanden ist nicht Ausdruck eines genetisch determinierten Polymorphismus (Erläuterungen s. Text).

1.3 Meerschweinchen C3

Auch beim Meerschweinchen (Ms) konnte die dritte Komplementkomponente problemlos ohne Immunfixation dargestellt werden. Es wurden 453 Serumproben einzelner Ms der Auszuchtpopulation sowie Serumproben von jeweils mehreren Ms der Inzuchtstämme 2, 13, C4D, B, C, AC, AD, Denmark, PCA, OM₃, BE und R9 elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der unspezifischen Fixation mit Methanol zeigte sich bei allen untersuchten Proben nur ein einziger, einheitlicher Phänotyp (Abb. 3). In Abb. 3 sind neben vier repräsentativen und einheitlichen Meerschweinchen-C3-Phänotypen noch die drei häufigsten humanen C3-Phänotypen F, S, FS sowie ein hochgereinigtes Ms-C3-Präparat dargestellt. Das C3 dominiert im Elektrophoresemuster des Ms als kräftige Bande nur wenig vom Auftragspunkt anodisch abgesetzt.

Im Vergleich mit dem humanen C3 sind einige Eigenschaften des Ms-C3 bemerkenswert:

Die Intensität der Ms-C3-Bande entspricht der eines humanen homozygoten Phänotyps. Das humane C3 weist jedoch neben der stärkeren Hauptbande eine schwächere anodische Minorbande auf, die beim Ms-C3 fehlt. Die Wanderungsgeschwindigkeit des Ms-C3 ist unter gleichen Elektrophoresebedingungen vergleichsweise erheblich herabgesetzt. Dagegen läuft das Transferrin (Tf) des Ms schneller zur Anode als dessen humanes Homolog. Das hat zur Folge, daß nach Substitution des Calciumlactats in den Puffern durch EDTA die Wanderungsgeschwindigkeit des C3 zwar deutlich erhöht wird, dieses aber nicht in den Transferrinbereich gelangt und deshalb auch nicht durch die Tf-Bande überlagert wird. Das C3 des Ms läßt sich also im Gegensatz zum humanen C3 auch ohne Ca^{++} -Ionenzusatz im Puffer darstellen.

Eine Verlängerung der Elektrophoresedauer auf sechs Stunden ließ zwar die C3-Bande entsprechend weiter zur Anode wandern, führte aber zu keiner Auftrennung der Bande.

Meerschweinchen C3

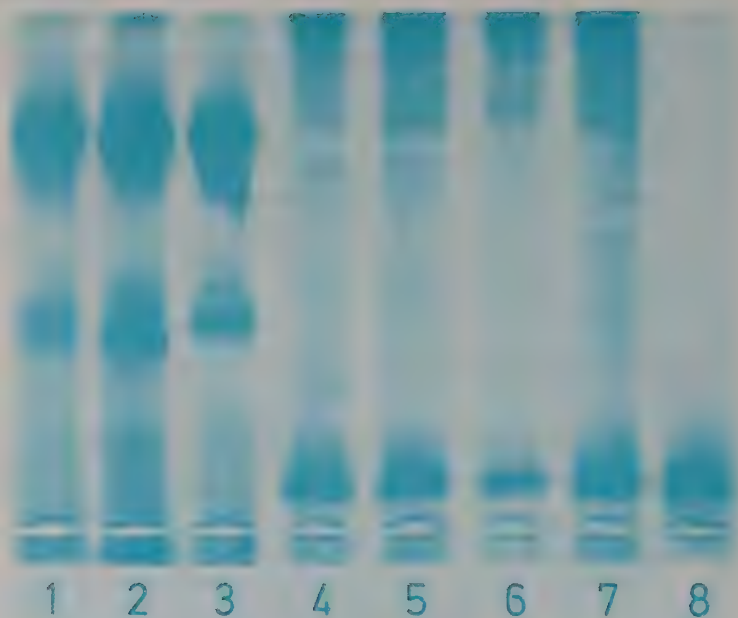


Abb. 3: Die C3-Bandenmuster des Meerschweinchens im Vergleich zu den häufigsten humanen C3-Phänotypen, dargestellt aus frischen Serumproben in der Agarosehochspannungselektrophorese. Die Anode befindet sich oben. Humane Serumproben, C3-FS: 1, C3-SS: 2, C3-FF: 3
(Anmerkungen zur Nomenklatur s. Text)
Serumproben von Meerschweinchen: 4 - 7
Gereinigtes Meerschweinchen C3: 8

1.4 Meerschweinchen Faktor B

Die niedrige Serumkonzentration des Faktor B erforderte die Immunfixation mit monospezifischem Anti-Ms-B. Wie die Abb. 4 zeigt, ließen sich drei verschiedene Phänotypen darstellen, die auf zwei ladungs-differente Varianten Bf-F und Bf-S zurückgeführt werden konnten.

Die Bezeichnungen Bf für das Gen des Faktor B, Bf-F für die schnelle Molekülvariante (fast) und Bf-S für die langsame Variante (slow) entsprechen der Empfehlung des Complement Nomenclature Committee (Herausgeber: K.F. Austen) vom International Congress of Immunology, Brighton, England, 1974.

Bei zwei der drei beobachteten Phänotypen (F und S) besteht das Bandenmuster aus einer stärkeren Hauptbande (die 3. vom Auftragspunkt), zwei Banden mittlerer Intensität (die 1. und 4.) und zwei weniger starken Minorbanden (die 2. und 5.). Das Bandenmuster des dritten Phänotyps (FS), entspricht der einfachen Kombination der beiden anderen Bandenmuster. Dies wird in der Abb. 4 deutlich, in der dem Phänotyp Bf-FS das Bandenmuster einer Mischung gleicher Volumina Bf-F und Bf-S Seren (F + S) gegenübergestellt ist. Die Intensität der einzelnen Banden ist annähernd halb so groß wie die der Bf-F und Bf-S Phänotypen. Die Tiere mit den Phänotypen Bf-F und Bf-S sind demnach homozygot für die schnelle bzw. langsamere Variante, während der Phänotyp Bf-FS dem heterozygoten Zustand entspricht. Die Allele, die die beiden Bf-Varianten determinieren, wurden nach den Wanderungsgeschwindigkeiten ihrer Produkte Bf^F und Bf^S genannt.

Die Typisierung von 372 Auszucht-Ms ergab die in der Tab. 1 zusammengefaßte Phänotypenverteilung. Aus den beobachteten Phänotypenhäufigkeiten wurden die Allelfrequenzen errechnet. Danach war Bf^F mit einer Frequenz von 0,624 das etwa häufigere Allel, während Bf^S eine Frequenz von 0,376 aufwies. Zur Berechnung der theoretisch zu erwartenden Phänotypenhäufigkeiten wurden die Allelfrequenzen in die Hardy-Weinberg-Gleichung eingesetzt. Wie der χ^2 -Test zeigte, wichen die Beobachtungswerte nicht signifikant von den Erwartungswerten ab ($\chi^2 = 1,377$;

$p(f = 1) > 0,2$), so daß das Hardy-Weinberg-Gesetz und damit ein Kriterium für das Vorliegen eines genetisch determinierten Polymorphismus erfüllt war.

Meerschweinchen Faktor B



Abb. 4: Faktor B-Polymorphismus des Meerschweinchens, dargestellt aus frischen Serumproben in der Agarosehochspannungselektrophorese mit nachfolgender Immunfixation mit monospezifischem Anti-Meerschweinchen-B. Die Anode befindet sich oben. F, S und FS repräsentieren die beobachteten Bf-Phänotypen (Anmerkungen zur Nomenklatur s. Text). F + S entstand aus einer Mischung gleicher Volumina homozygoter Bf-F und Bf-S Seren und gleicht dem Phänotyp eines natürlich auftretenden Heterozygoten.

Tabelle 1: Phänotypenhäufigkeiten und Allelfrequenzen im Bf-System des Meerschweinchens

Beobachtungswerte	Erwartungswerte ^a	Phänotypen	Allelfrequenzen
150	144,69	F	0,624
164	174,62	FS	
58	52,69	S	0,376
372	372,00		1,000

^a Die Erwartungswerte wurden ermittelt durch Einsetzen der beobachteten Allelfrequenzen in die Hardy-Weinberg-Gleichung $p^2 + 2pq + q^2 = 1$; ($p = 0,624$, $q = 0,376$). $\sum \chi^2 = 1,377$; $p(f = 1) > 0,2$ (108).

Um den Vererbungsmodus der Faktor B-Varianten zu charakterisieren, wurden alle möglichen Kombinationen von Phänotypen gekreuzt. Wie aus der Tab. 2 und der Abb. 8 hervorgeht, entsprach das Segregationsmuster bei 30 untersuchten Familien mit 88 Nachkommen dem einfachen formalgenetischen Modell eines autosomalen Bf-Strukturgens mit zwei kodominanten Allelen Bf^F und Bf^S.

Neben dem Faktor B wurde auch dessen größeres Konversionsprodukt Bb untersucht. Dazu wurden die Serumproben mit Zymosan inkubiert. Dabei kommt es zu einer physiologischen Spaltung des Faktor B durch die Induktion des alternativen Weges der Komplementaktivierung. Nach der Elektrophorese und Immunfixation mit monospezifischem Anti-Ms-B, welches auch antigenetisch Bb erfaßt, wurden drei differente Bb-Phänotypen beobachtet (s. Abb. 5). Im Gegensatz zum nativen Faktor B Molekül wandert dessen größeres Konversionsprodukt Bb zur Kathode. Wie aus der Abb. 5 ersichtlich, besteht das Bandenmuster bei Homozygoten aus einer Hauptbande und einer anodischen Minorbande, bei Heterozygoten aus der einfachen Überlagerung der entsprechenden Banden homozygoter Tiere. Die beiden Bb-Varianten spiegelten die differenten elektrophoretischen Beweglichkeiten der nativen Faktor B-Varianten wider, indem das Spaltprodukt von Bf-F weniger schnell zur Kathode und damit relativ schneller zur Anode wanderte als das Spaltprodukt von Bf-S. Bb Homozygote waren, wie nicht anders zu erwarten, auch im ungespaltenen, nativen Muttermolekül B homozygot und Bb Heterozygote waren B-heterozygot. Die Bb-Phänotypen ließen sich somit eindeutig den B-Phänotypen zuordnen. Dieser Befund bestätigte das am nativen Faktor B entwickelte formalgenetische Modell von einem Bf-Strukturgen mit zwei kodominanten Allelen..

Tabelle 2: Familiendaten zur Bf-Vererbung

Genotypen der Eltern	Anzahl Familien	Genotypen und Anzahl der Nachkommen		
		FF	FS	SS
FF x FF	5	15 (15) ^a	0 (0)	0 (0)
FF x FS	3	4 (4)	4 (4)	0 (0)
FF x SS	10	0 (0)	31 (31)	0 (0)
FS x FS	5	3 (3,5)	7 (7)	4 (3,5)
FS x SS	3	0 (0)	5 (4,5)	4 (4,5)
SS x SS	4	0 (0)	0 (0)	11 (11)

^a Die nach den Mendelschen Vererbungsgesetzen erwarteten Werte sind in Klammern angegeben.

Meerschweinchen Bb

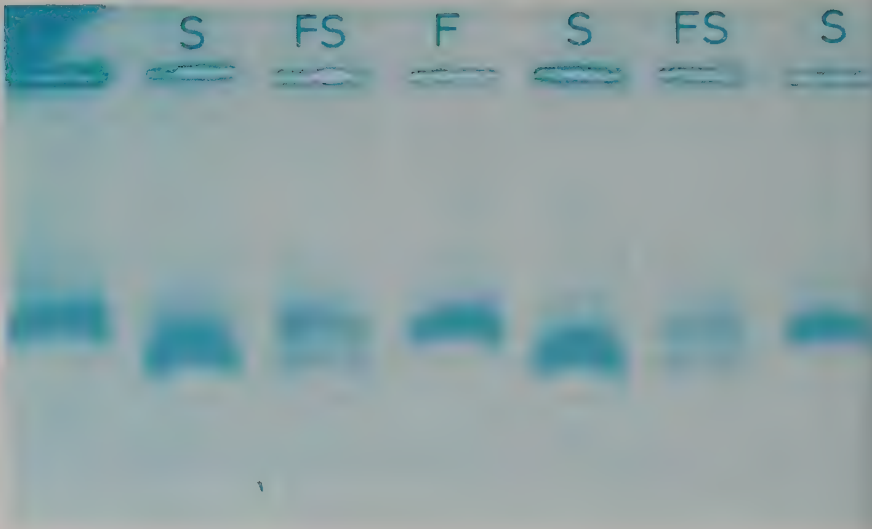


Abb. 5: Polymorphismus des Bb-Fragments von Faktor B des Meerschweinchens, dargestellt in der Agarosehochspannungselektrophorese mit nachfolgender Immunfixation mit monospezifischem Anti-Meerschweinchen-B. Die Serumproben wurden mit Zymosan vorinkubiert. Die Anode befindet sich oben. Die Differenzen der nativen Faktor B-Varianten in der elektrophoretischen Mobilität spiegeln sich im Bb-Fragment wider.

1.5 Meerschweinchen C4

Bei Maus und Ms gelang die Darstellung von C3 und Faktor B sowohl mit Plasma- als auch mit Serumproben. Für die Typisierung von C4 ergab die Verwendung von Serum jedoch nach der Immunfixation mit monospezifischem Anti-Ms-C4 nur schwache, verwaschene Präzipitatzonen, die nicht zu interpretieren waren. Mit EDTA-Plasmaproben wurden dagegen diskrete Bandenmuster erzielt. Dieses Phänomen ließ sich dadurch erklären, daß das C4 des Ms während der einstündigen Gerinnung bei Raumtemperatur rasch gespalten wird. Dieser Vorgang wurde durch einen immunoelektrophoretischen Vergleich von Plasma- und Serumproben desselben Tieres (Abb. 6) verdeutlicht. Bei der elektrophoretischen Untersuchung wurde ein ausgeprägter Polymorphismus des C4 entdeckt. Sechs unterschiedliche Phänotypen wurden beobachtet (Abb. 7), die auf drei C4 Varianten zurückgeführt werden konnten. Bei für eine dieser Varianten homozygoten Tieren setzten sich die Phänotypen zusammen aus einer Hauptbande und einer schwächeren, anodisch abgesetzten Minorbande. Das elektrophoretische Muster in Heterozygoten stellte eine einfache Kombination entsprechender Bilder von Homozygoten dar mit halber Intensität der Banden. Als C4-F wurde die schnellste Variante bezeichnet, als C4-S die langsamere und als C4-S¹ die am wenigsten zur Anode laufende. Die entsprechenden Allele wurden C4^F, C4^S bzw. C4^{S1} genannt. Die Typisierung von 175 Ms ergab die in Tab. 3 zusammengefaßte Phänotypenverteilung. Die daraus resultierende Allelfrequenzberechnung zeigte, daß C4^S mit einer Frequenz von 0,403 das häufigste Allel war, während C4^F und C4^{S1} mit Frequenzen von 0,351 respektive 0,246 etwas weniger verbreitet auftraten. Die beobachteten Phänotypenhäufigkeiten wichen nicht signifikant von den Erwartungswerten ab, die durch Einsetzen der ermittelten Allelfrequenzen in die Hardy-Weinberg-Gleichung errechnet wurden.

Meerschweinchen C4 in Serum- und Plasmaproben



Abb. 6: Immunelektrophorese von Meerschweinchenserum (oben) und Meerschweinchenplasma (unten) gegen Anti-Meerschweinchen-C4. Die Anode befindet sich auf der rechten Seite. Die Laufzeit betrug 120 Min. bei 8V/cm. Die Präzipitationslinien mit dem Meerschweinchenserum weisen auf eine Konversion des C4 hin. Die Präzipitationslinie mit der Plasmaprobe zeugt für die Monospezifität des Anti-Meerschweinchen-C4.

Meerschweinchen C4

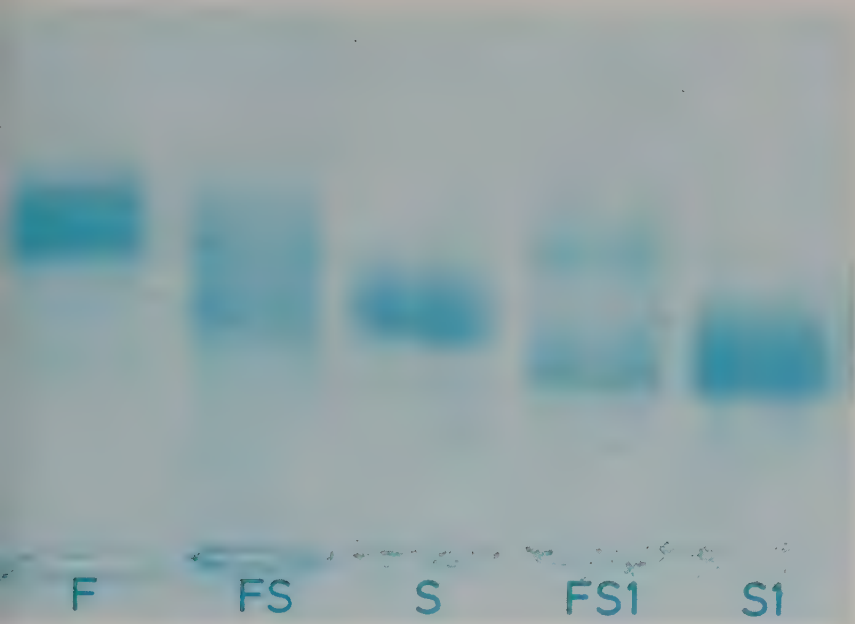


Abb. 7: C4-Polymorphismus des Meerschweinchens, dargestellt aus Plasmaproben in der Agarosehochspannungselektrophorese mit nachfolgender Immunfixation mit monospezifischem Anti-Meerschweinchen-C4. Die Anode befindet sich oben. Von den sechs beobachteten C4-Phänotypen, die sich jeweils aus zwei der drei Varianten C4-F, C4-S und C4-S1 konstituieren, sind fünf in der Abbildung gezeigt. (Anmerkungen zur Nomenklatur s. S. 27)

Tabelle 3: Phänotypenhäufigkeiten und Allelfrequenzen im C4-System des Meerschweinchens

Beobachtungswerte	Erwartungswerte ^a	Phänotypen	Allelfrequenzen
24	21,61	F	0,351
32	28,40	S	0,403
13	10,57	SI	0,246
46	49,55	FS	
29	30,22	FSI	
31	34,65	SSI	
175	175,00		1,000

^a Die Erwartungswerte wurden ermittelt durch Einsetzen der beobachteten Allelfrequenzen in die Hardy-Weinberg-Gleichung $p^2 + q^2 + r^2 + 2pq + 2pr + 2qr = 1$; ($p = 0,351$, $q = 0,403$, $r = 0,246$). $\sum \chi^2 = 2,03$; $p(f = 3) > 0,5 (108)$.

Vererbung von Bf und C4 Allelen

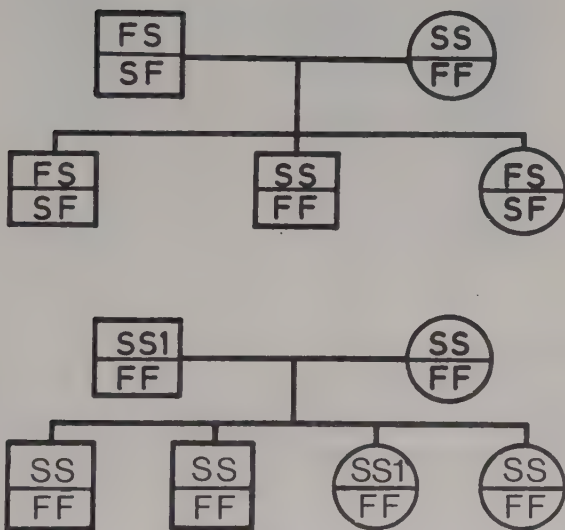


Abb. 8: Familienstudien zur Vererbung der Bf- und C4-Genotypen.
Die C4-Genotypen sind in den oberen Segmenten der Quadrate (Männchen) und Kreise (Weibchen) angegeben, die Bf-Genotypen in den unteren.

Die Erfüllung dieses Kriteriums zeigte, daß sich die C4 Allele im Gleichgewicht befanden. Ein Phänotyp, der gleichzeitig alle drei C4-Alлотypen aufwies (C4-FSS1), wurde nicht beobachtet. Dieser Befund und die Erfüllung des Hardy-Weinberg Gesetzes wiesen schon darauf hin, daß C4^F, C4^S und C4^{S1} Allele eines einzigen Strukturgens sind. Diese Vorstellung wurde dann gestärkt durch Familienstudien, in denen der Vererbungsmodus der drei Allele verfolgt wurde. Bei 21 untersuchten Familien mit 46 Nachkommen wurden die C4-Varianten gemäß den Mendelschen Gesetzen vererbt. Zwei repräsentative Familien zeigt Abb. 8. Das Segregationsmuster entsprach formalgenetisch einem autosomalen C4-Strukturgen mit drei kodominanten Allelen C4^F, C4^S und C4^{S1}.

1.6 Meerschweinchen C4-Defekt

Der Polymorphismus des C4-Strukturgens ermöglichte es, nun die Natur der C4-Defizienz des Meerschweinchens in einer anschaulichen Weise zu analysieren. Bisher waren nämlich aufwendige Versuche, wie z.B. Zellhybridisierungen notwendig, um Hinweise darüber zu erhalten, ob es sich bei der C4-Defizienz um einen Defekt des Struktur- oder eines Regulatorgens handelt. Die Interpretationen dieser Versuche sprachen für einen Strukturgendefekt (24). In diesem Fall müßte der Defekt als stilles C4⁰ Allel mit den drei häufigsten C4 Allelen konkurrieren. Um den Allelomorphismus des C4⁰ Gens zu demonstrieren, wurden Tiere des C4-defekten Meerschweinchenstammes gekreuzt mit ausgezüchteten Ms der Genotypen C4^{SS1}, C4^{SS} und C4^{S1S1}. Die F₁-Generation wurde wieder rückgekreuzt mit dem C4-defekten Stamm. Der Zustand der Homo- bzw. Heterozygotie wurde kontrolliert mit der Rocket-Immunelektrophorese nach Laurell (76, s. Abb. 10).

Der C4-Defekt des Meerschweinchens

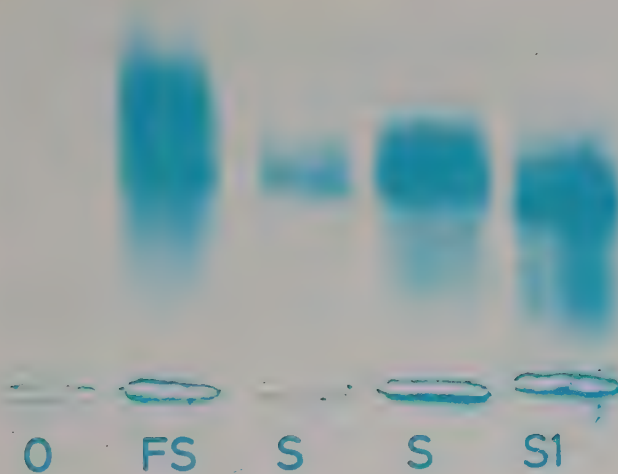


Abb. 9: Der C4-Defekt des Meerschweinchens, dargestellt aus Plasmaproben in der Agarosehochspannungselektrophorese mit nachfolgender Immunfixation mit Anti-Meerschweinchen-C4. Die Anode befindet sich oben. Die Phänotypen homozygot (1. v. links: 0) und heterozygot (3. v. links: S) C4-defekter Meerschweinchen sind den Phänotypen normaler Meerschweinchen (FS, S, S1) gegenübergestellt.

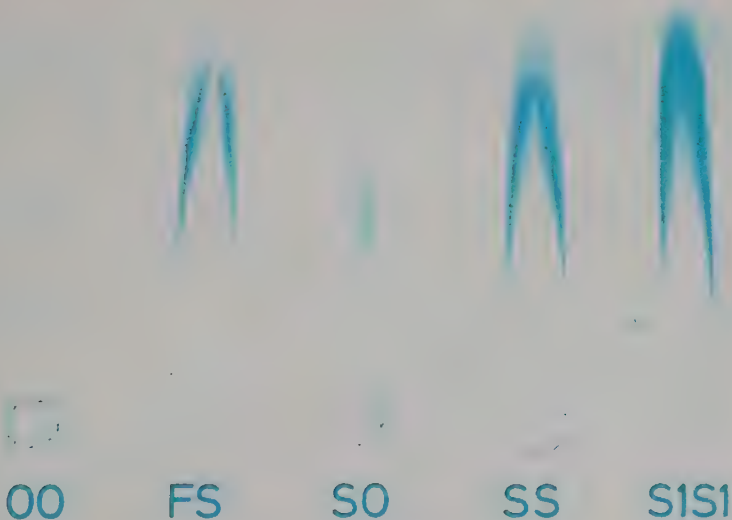


Abb. 10: Quantitative Bestimmung der C4-Plasmakonzentration von denselben Tieren wie in Abb. 9 in der Rocket-Immunoelektrophorese. Die Anode befindet sich oben. Die Laufzeit betrug 12 Stunden. Heterozygot C4-defekte Meerschweinchen (S0) können gut von homozygot C4-defekten (00) und normalen Meerschweinchen unterschieden werden.

Charakteristische Bandenmuster von homo- und heterozygoten C4-defekten Ms zeigt Abb. 9. Homozygot C4-defekte Ms wiesen überhaupt keine Banden auf. Bei Heterozygoten bestand das Bandenmuster immer nur aus einem Paar von Haupt- und Minorbanden, welche sich in diesem Fall ausnahmslos einem der Allele $C4^S$ oder $C4^{S1}$ zuordnen ließen. Die Intensität dieser Banden war etwa halb so stark wie die eines für das entsprechende Allel homozygoten Ms und ebenso stark wie eines der beiden Bandenpaare "normal" Heterozygoter. Ein heterozygot C4-defektes Ms mit zwei Bandenpaaren wurde nicht beobachtet. Die Nachkommen von Zuchtpaaren mit einem heterozygoten Elternteil des Genotyps $C4^{SS1}$ erbten entweder die C4-S- oder die C4-S1-Variante, aber nie beide zugleich. Während also das eine Allel durch das $C4^0$ Gen ersetzt wurde, blieb die Expression des anderen Allels davon unberührt vollständig erhalten. Die elektrophoretischen Bandenmuster stimmten demnach überein mit dem Modell eines defekten Strukturgens, welches sich allel zu $C4^F$, $C4^S$ und $C4^{S1}$ verhält. Da in der ausgezüchteten Ms-Population keine Individuen gefunden wurden, die homo- oder heterozygot C4-defekt waren, wurde das $C4^0$ Allel als viertes seltenes Allel des C4-Polymorphismus betrachtet.

2. KOPPLUNGSTUDIEN

2.1 Kopplung von Bf und C4 beim Meerschweinchen

Die Polymorphismen von C4 und Bf bildeten eine ausgezeichnete Grundlage für Kopplungsstudien. Von Interesse waren die Kopplungsbeziehungen der Loci Bf und C4 untereinander und bezüglich des GPLA-Systems. Um zu prüfen, ob C4 und Bf gemeinsam und möglicherweise eng zusammen auf einem Chromosom liegen, d.h. gekoppelt sind, wurde die Vererbung der Bf- und C4-Phänotypen in 21 Familien mit 46 Nachkommen studiert. Repräsentative Familien sind in der Abb. 8 dargestellt. Es fiel auf, daß die C4 und Bf Allele nicht unabhängig voneinander segregierten, sondern einheitlich als Haplotyp vererbt wurden. Eigentümlicherweise bildeten immer Bf^F mit C4^S oder C4^{S1} bez. Bf^S mit C4^F einen Haplotyp. Bei den untersuchten Familien zeigte sich in keinem Fall ein Crossing-over und damit eine Auflösung dieser Assoziation. Um die dadurch ange deuteten Kopplungsungleichgewichte zu verifizieren, wurden bei 175 nicht verwandten Ms der Auszuchtpopulation sowohl die C4- als auch die Bf-Phänotypen bestimmt. Das Ergebnis ist in Tab. 4 zusammengefaßt. In dieser Populationsstichprobe traten nur sechs von theoretisch achtzehn möglichen Kombinationen von Phänotypen auf. Auch die Typisierung von Plasmaproben peruanischer Wild-Ms ergab keine anderen als die in der Populationsstichprobe beobachteten Phänotypenkombinationen und bestätigte damit die extrem ausgeprägten Kopplungsungleichgewichte zwischen Bf^S und C4^F einerseits und Bf^F und C4^S bzw. C4^{S1} andererseits.

Tabelle 4: Häufigkeiten von Bf- und C4-Genotypenkombinationen in 175 Meerschweinchen

Bf-Genotypen	C4-Genotypen						Gesamt
	FF	SS	S1S1	FS	FS1	SS1	
FF	0	32	13	0	0	31	76
SS	24	0	0	0	0	0	24
FS	0	0	0	46	29	0	75
Gesamt	24	32	13	46	29	31	175

2.2 Kopplung des Faktor B mit dem C4-Defekt des Meerschweinchens

Nachdem diese C4/Bf Assoziationen entdeckt worden waren, stellte sich die Frage, ob auch das $C4^0$ Allel immer nur in Verbindung mit einem bestimmten Bf Allel auftritt. Bei der Bf-Typisierung einiger Tiere des C4-defekten Stammes stellte sich heraus, daß alle den gemeinsamen Genotyp Bf^{SS} besaßen. Das $C4^0$ Allel schien also mit dem Bf^S Allel assoziiert zu sein. Um diese Assoziation zu verifizieren, wurden C4-defekte Ms mit ausgezüchteten Ms des Genotyps Bf^{FF} gekreuzt. Die Rückkreuzung der F_1 -Generation erfolgte wieder mit homozygot C4-defekten Ms. Das Ergebnis dieser Kopplungsstudie zeigt Abb. 11. Die F_2 -Nachkommen offenbarten nur zwei der bei freier Rekombination theoretisch zu erwartenden vier Phänotypen. Homozygot C4-defekte Ms waren homozygot Bf^{SS} und heterozygot C4-defekte Ms waren heterozygot Bf^{FS} . Die Abwesenheit von Bf^F in homozygot C4-defekten Tieren der F_2 -Generation lieferte den klaren Beweis für die erwartete Assoziation von $C4^0$ und Bf^S . $C4^0$ zeigt somit das gleiche Vererbungs- und Assoziationsverhalten wie $C4^F$. Das gemeinsame Segregieren von $C4^0$ und Bf^S festigte außerdem die Vorstellung, daß $C4^0$ das vierte, seltene Allel des C4-Polymorphismus ist.

2.3 Bf- und C4-Genotypen in Inzuchtstämmen

Die Assoziation von $C4^0$ und Bf^S gab schon indirekt Aufschluß über die Kopplungsbeziehung der beiden Loci C4 und Bf zu dem Haupthistokompatibilitätssystem des Ms, dem GPLA. Shevach et al. konnten nämlich 1976 nachweisen, daß der C4-Defekt des Ms mit dem GPLA gekoppelt ist (114). Da sich $C4^0$ als Allel des C4-Strukturgens herausstellte und außerdem mit einem Allel des Bf Locus assoziiert ist, müßte folglich sowohl der C4- als auch der Bf-Polymorphismus mit den Loci des GPLA-Systems gekoppelt sein.

Kopplung von $C4^0$ mit Bf^S

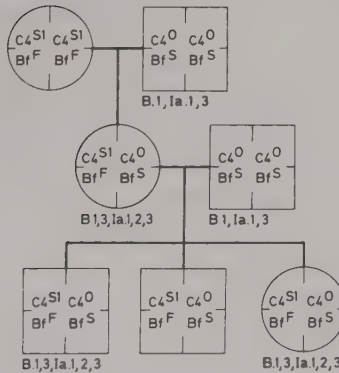
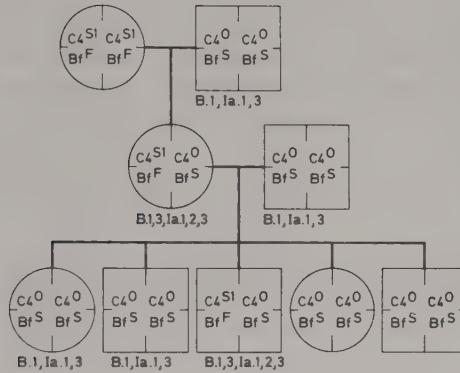


Abb. 11: Familienstudien zum Nachweis der Kopplung von $C4^0$ mit Bf^S und den GPLA-Antigenen. In den oberen Segmenten der Quadrate (Männchen) und Kreise (Weibchen) sind die $C4$ -Genotypen angegeben, in den unteren Segmenten die Bf -Genotypen. Unter den Quadraten und Kreisen sind die GPLA-Antigene angegeben. Die Abwesenheit von Bf^F in homozygot $C4$ -defekten Tieren der F_2 -Generation beweist die Kopplung von $C4^0$ mit Bf^S .

Tabelle 5: Bf- und C4-Genotypen in verschiedenen Meerschweinchen-Inzuchtstämmen

Stamm	B Locus ¹	S Locus ^{1,2}	I Region ¹	Bf Locus	C4 Locus	Anzahl der unter- suchten Tiere
NIH 2	B.1	S.1	Ia.2,4,5	SS	FF	15
NIH 13	B.1	S.1	Ia.1,3,5	SS	FF	17
C4D	B.1	-	Ia.1,3	SS	00	14
Bio AC	B.2	S.1	Ia.1,3	SS	FF	12
Bio C	B.2	-	Ia.1	SS,FS	FF,FS	13
Bio AD	B.3	-	Ia.1,3	FF	SS	10
Bio B	B.1	-	Ia.1,4	FF	SS	11
Denmark	B.3	-	Ia.1,3	FF	SS	5
BE	B.3	-	Ia.1	FF	SS	3
PCA	B.3	-	Ia.1,3	FF	SS,SS1,S1S1	11
R9	B.3	-	Ia.1,3	FF,FS,SS	FF,FS1,S1S1	5
OM3	B.3	-	Ia.1,3	FF	S1S1	9

¹ Die GLPA-Antigene wurden den Arbeiten von Geczy et al. (45, 47) entnommen.

² Es wurden bisher nur bei den Stämmen 2, 13 und AC ein Genprodukt des S Locus entdeckt.

Um Näheres über diese mutmaßliche Kopplungsbeziehung zu erfahren, wurden die C4- und Bf-Genotypen bei jeweils mehreren Tieren einzelner Inzuchtstämme bestimmt, deren GPLA-Antigene aus der Literatur bekannt waren (45, 123). Das Resultat dieser Typisierung ist in Tab. 5 zusammengefaßt. Die oben beschriebenen Assoziationen von bestimmten C4 und Bf Allelen wurde bei den Tieren der Inzuchtstämme wiedergefunden. Die histokompatiblen Stämme NIH 2, NIH 13, Bio AC, Bio AD, Bio B und BE wiesen in sich keine Bf- oder C4-Heterogenitäten auf, d.h. alle Tiere eines Stammes hatten identische C4- und Bf-Genotypen. Auch der noch nicht vollständig histokompatible Stamm OM3 (41) war homogen bezüglich seiner C4 und Bf Allele. Dagegen waren Bio C und die erst teilweise ingezüchteten Stämme PCA und R9 teils hetero- teils homozygot für ihre C4 und Bf Allele (s. Tab. 5). Die C4- und Bf-Homozygotie korrelierte mit der Histokompatibilität der einzelnen Inzuchtstämme demnach recht gut. Wie aus Tab. 5 hervorgeht, bestand keine strenge Assoziation von einzelnen GPLA-Antigenen mit bestimmten C4 oder Bf Allelen. Ob allerdings das C4^{S1} Allel immer nur im Verein mit GPLA-B.3 auftritt oder auch mit anderen Allelen des GPLA-B Locus einen Haplotyp bilden kann, ging aus diesen Daten nicht hervor.

2.4 Kopplung von Bf und C4 mit dem GPLA-System

Der direkte Beweis für eine Kopplung der Loci C4 und Bf mit dem GPLA-System ließ sich durch Familienstudien erbringen, bei denen die Vererbung der C4-, Bf- und GPLA-Phänotypen verfolgt werden konnte. Die GPLA-Typisierung war in dem hiesigen Labor nicht möglich; sie wurde freundlicherweise von Herrn Dr. A.F. Geczy, Institut für Klinische Immunologie, Universität Bern, durchgeführt. Insgesamt wurden sechs Familien mit 23 Nachkommen untersucht.

Kopplung von Bf und C4 mit dem GPLA-System

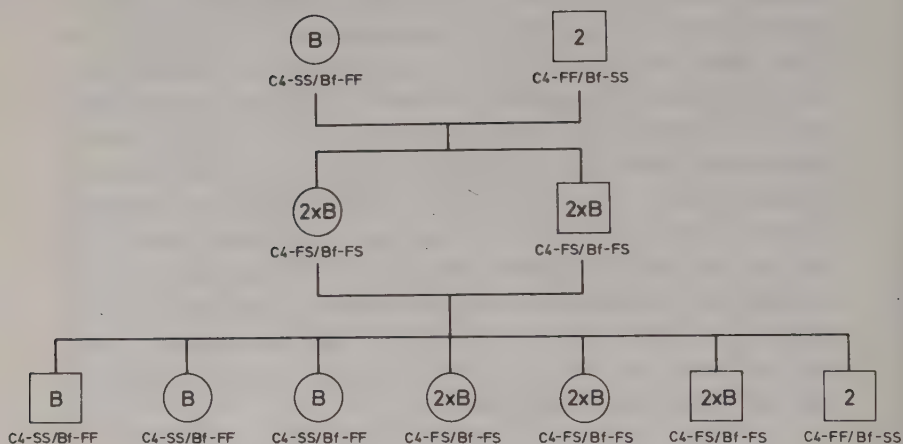


Abb. 12: Nachweis der Kopplung von Bf und C4 mit dem GPLA-System in einer repräsentativen Familienstudie. 2 symbolisiert die GPLA-Antigene des Stammes NIH 2; B symbolisiert die GPLA-Antigene des Stammes Bio B (s. Tab. 5). In dieser Familie segregierten die Varianten Bf-S und C4-F mit den GPLA-Antigenen des Stammes NIH 2, und die Varianten Bf-F und C4-S segregierten mit den GPLA-Antigenen des Stammes Bio B.

In diesen Familien waren entweder ein oder beide Elternteile heterozygot für C4, Bf und die GPLA Allele. Die Abb. 12 demonstriert anhand einer repräsentativen Familie die gemeinsame Vererbung der C4-, Bf- und GPLA-Phänotypen. Die Familie entstand nach einer Kreuzung des Stammes NIH 2 mit dem Stamm Bio.B. Während C4^F und Bf^S mit den GPLA Allelen des Stammes NIH 2 segregierten, wurden C4^S und Bf^F zusammen mit den GPLA Allelen des Stammes Bio B vererbt. Dieser Befund und gleichsinnige Ergebnisse bei den anderen Familienstudien beweisen die erwartete genetische Kopplung der Loci C4 und Bf mit dem GPLA-System.

2.5 Crossing-over Familien

Nachdem die genetische Kopplung der GPLA-Antigene mit C4 und Bf nachgewiesen worden war, interessierte es nun, Näheres über die lineare Anordnung dieser Loci auf dem betreffenden Chromosom zu erfahren. Das bisherige Modell des GPLA-Systems von Geczy und de Weck (47) mußte weitgehend ohne formalgenetische Beweise auskommen. Die Chancen, einen formalgenetischen Beweis in der Art eines Crossing-overs zu erhalten, war jetzt jedoch gestiegen, da die Zahl der genetischen Marker des GPLA-Systems durch C4 und Bf erhöht worden war. In der Tat wurden auch zwei Familien mit je zwei Nachkommen entdeckt, in denen ein Crossing-over eine Rekombination der C4, Bf und GPLA Allele verursacht hatte. Bei der Familie I (Abb. 13) waren die Ia-Spezifitäten nicht informativ. Das Crossing-over konnte deshalb nur zwischen dem GPLA-B Locus und den Loci für C4 und Bf lokalisiert werden. Es ist dennoch offensichtlich, daß beide Nachkommen das B.2 Allel vom Vater erhalten haben. Während jedoch der männliche Nachkomme vom Vater C4^S und Bf^F erbte, erhielt der weibliche C4^F und Bf^S. Bei einem der beiden Nachkommen hatte folglich ein Crossing-over zwischen GPLA-B und C4/Bf zur Rekombination dieser Gene geführt. Wie die Untersuchung weiterer Nachkommen desselben Elternpaares zeigte, trug der männliche Nachkomme den rekombinanten Haplotyp.

Crossing-over Familie I

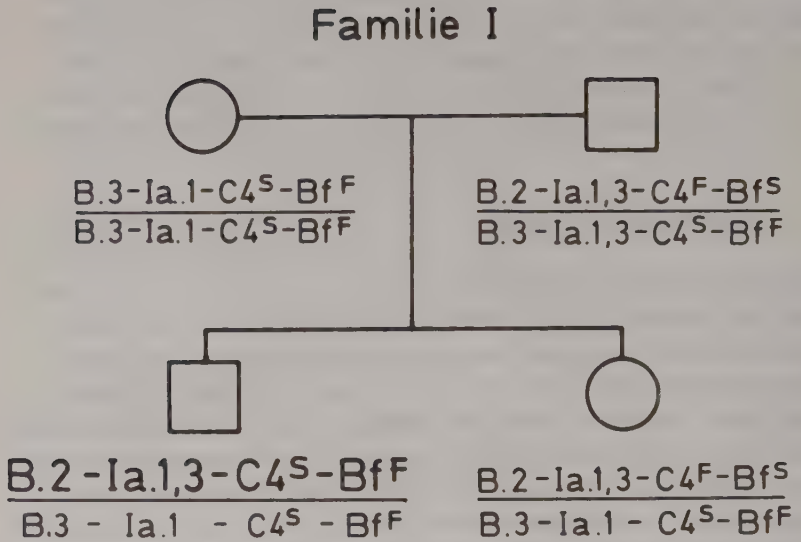


Abb. 13: Der rekombinante Haplotyp ist fettgedruckt. Die Gen-
 ordnung B-Ia-C4-Bf ist hypothetisch. Die Nachkommen
 erbten GPLA-B.3 vom Vater einmal zusammen mit Bf^S
 und C4^F, das andere Mal zusammen mit Bf^F und C4^S
 (weitere Erläuterungen s. Text).

Bei der Familie II waren auch die Ia-Antigene informativ. Die Phänotypen deuteten auf ein Crossing-over hin zwischen GPLA-B einerseits und GPLA-Ia,C4 und Bf andererseits. In der Abb. 14 ist eines der denkbaren Haplotypenmodelle wiedergegeben, die sich von den Phänotypen herleiten ließen. Auch die anderen möglichen Modelle würden zu derselben Lokalisation des Crossing-over führen. Wie die Abb. 14 zeigt, erbten beide Nachkommen vom Vater das B.3 Allel. Während der weibliche Nachkomme B.3 zusammen mit Ia.2, C4^{S1} erbte, erhielt der männliche B.3 zusammen mit Ia.1 und C4^S. Bei den in der Abb. 14 angegebenen Haplotypen hätte folglich ein Crossing-over zwischen GPLA-B einerseits und GPLA-Ia und C4 andererseits bei dem männlichen Nachkommen zur Rekombination dieser Gene geführt. Läge jedoch beim Vater das B.3 Allel mit Ia.1 und C4^S auf einem Chromosom, so würde bei gleicher Lokalisation des Crossing-over der weiblichen Nachkommen den rekombinanten Haplotyp tragen.

Familie I und II sind die ersten Familien, bei denen GPLA-Rekombinationen entdeckt wurden. In der Familie II wurde zudem der erste formalgenetisch bedeutsame Hinweis für die GPLA-Struktur erhalten. Das gemeinsame Segregieren von Ia-Antigenen und C4 Allelen gegenüber dem B.3 Antigen weist darauf hin, daß der GPLA-B Locus außerhalb der Loci Ia und C4 einzuordnen ist.

Crossing-over Familie II

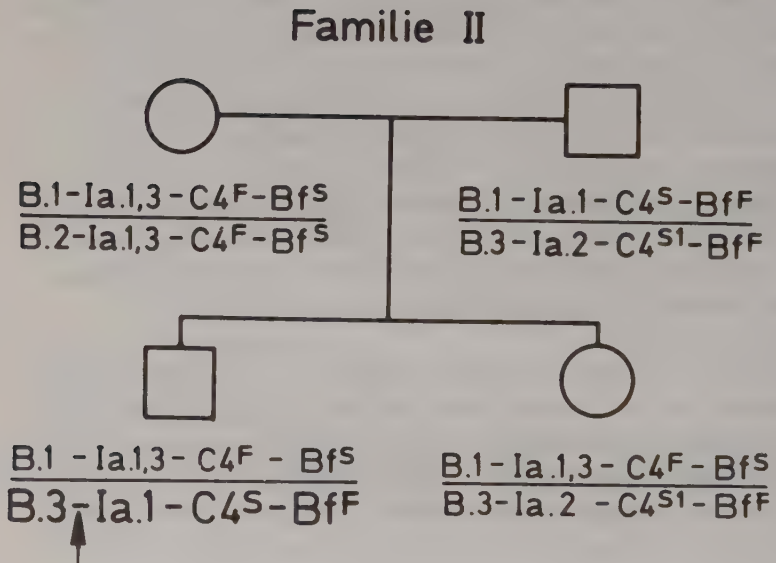


Abb. 14: Der rekombinante Haplotyp ist fettgedruckt, der Pfeil zeigt die Lokalisation des Crossing-over an. Die Genordnung ist hypothetisch. Der männliche Nachkomme erhielt vom Vater B.3 zusammen mit Ia.1 und C4^S, während der weibliche Nachkomme vom Vater B.3 zusammen mit Ia.2 und C4^{S1} erhielt (Erläuterungen im Text).

E. DISKUSSION

1. Die elektrophoretischen Erscheinungsformen der untersuchten Komplementkomponenten

Nachdem Allen 1974 die Kopplung des polymorphen Bf Locus mit dem HLA nachgewiesen hatte (2), rückten in der Genetik des Komplementsystems die für Kopplungsstudien prädestinierten Polymorphismen von Komplementkomponenten in den Vordergrund des Interesses. Zu Beginn dieser Arbeit waren Polymorphismen bekannt von den humanen Komplementfaktoren C3, C6 und Faktor B sowie von C3 und Faktor B des Rhesusaffen (3, 5, 6, 60, 125).

Während sich jedoch das C3 bei Mensch und Rhesusaffe als ausgeprägt polymorph erwies - beim Menschen wurden bis 1973 24 Varianten entdeckt (99) -, wurden bei der Maus weder von uns noch von anderen Autoren (39) polymorphe C3-Bandenmuster beobachtet. Es existierte nur ein einheitlicher Phänotyp. Auch der Faktor B der Maus zeigte keinen Polymorphismus. Es wurden zwar elektrophoretische Heterogenitäten entdeckt (s. Abb. 2), diese waren jedoch nicht genetischen Ursprungs, sondern Folge postsynthetischer Modifikationen. Die Einheitlichkeit der C3- und Bf-Phänotypen bei der Maus stimmte in gewisser Weise überein mit den Befunden von Shreffler und Passemore, die keinen elektrophoretischen Polymorphismus des Ss-Proteins entdecken konnten (117). Dieses Ergebnis gilt damit für die vierte Komplementkomponente, da das Ss-Protein funktionell, antigenetisch und physikochemisch als C4 identifiziert wurde (25, 74, 81).

Das Fehlen der Polymorphismen von Komplementkomponenten bei der Maus entsprach nicht den Erwartungen. Untersuchungen zu homologen Enzympolymorphismen verschiedener Spezies zeigten nämlich, daß für die Entstehung eines Polymorphismus in erster Linie die dem betreffenden Molekül zugrundeliegende Struktur von Bedeutung ist, während die Funktion und das das Molekül umgebende Milieu dabei eine untergeord-

nete Rolle spielten (127). Die funktionellen und physikochemischen Daten von C3 und Faktor B bei Mensch, Maus und Meerschweinchen (17, 21, 22, 51, 77) wiesen aber daraufhin, daß sich diese Faktoren in den einzelnen Spezies nicht wesentlich in Struktur und Funktion unterscheiden können. So überraschte es nicht, als kürzlich bei nicht ingezüchteten Swiss-Webster Mäusen sowohl ein C3- als auch ein Bf-Polymorphismus entdeckt werden konnte (96, 107). Bei Inzuchtstämmen fanden jedoch auch diese Autoren nur einheitliche C3- und Faktor B-Bandenmuster. Dies unterstrich die Sonderstellung der Swiss-Webster Mäuse, welche auch im H-2 Komplex Allele besitzen, die in den bekannten Inzuchtstämmen nicht auftreten (106). Das Fehlen von C3- und Bf-Polymorphismen bei Inzuchtstämmen könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Vielzahl der heute bekannten Stämme aus einer begrenzten Anzahl von Grundstämmen hervorgegangen sind, deren Genpool relativ klein war (69). In dieser Hinsicht wäre es nun interessant nachzuprüfen, ob bei den Swiss-Webster Mäusen auch ein Polymorphismus des C4 bzw. Ss-Proteins existiert.

Auch beim Meerschweinchen wurden keine polymorphen C3-Bandenmuster entdeckt. Die elektrophoretische Uniformität des C3 wurde auch bei peruanischen Wildmeerschweinchen beobachtet. Der Genpool dieser peruanischen Meerschweinchen unterscheidet sich vermutlich qualitativ von dem europäischer Zuchttiere. So ist es zwar nicht ausgeschlossen, jedoch sehr unwahrscheinlich, daß analog zu den Verhältnissen bei der Maus auch bei einer speziellen Meerschweinchenpopulation ein elektrophoretischer Polymorphismus des C3 entdeckt wird.

Während beim Meerschweinchen das C3 keinen Polymorphismus zeigte, konnte in dieser Arbeit ein genetisch determinierter Polymorphismus des Faktor B entdeckt und charakterisiert werden.

Dieser beruhte auf zwei verbreiteten kodominanten Allelen, Bf^F und Bf^S. Das elektrophoretische Bandenmuster der Allelprodukte bestand aus einer Haupt- und vier Minorbanden (s. Abb. 4). Diese phänotypische Komplexität bestätigte die auch bei Mensch, Rhesusaffe und Maus beobachtete Eigenart des Faktor B, postsynthetisch modifiziert in

multiplen Banden aufzutreten (6, 125). Das Bandenmuster Heterozygoter entsprach der einfachen Kombination der homozygoten Bilder und ließ auf einen monomeren Aufbau des Faktor B-Moleküls bei Maus und Meerschweinchen schließen. Beim Menschen vermuteten Alper et al. aufgrund des elektrophoretischen Bandenmusters, daß der Faktor B eine tetramere Struktur besitzt (6). Dieselben Autoren korrigierten jedoch später ihre Vorstellungen von der Molekülstruktur. Sie erhielten Beweise für einen monomeren Aufbau des Faktor B beim Rhesusaffen und beim Menschen (125). Damit stimmten Bandenmuster und Struktur des Faktor B des Meerschweinchen mit den Befunden bei Mensch und Affe überein. Während aber in diesen Spezies jeweils mehrere seltene Varianten existieren (6, 125), wurden beim Meerschweinchen außer Bf-F und Bf-S keine weiteren Varianten entdeckt. Auch die Serum- bzw. Plasmaproben von peruanischen Wildmeerschweinchen wiesen keine anderen Phänotypen auf.

Die Untersuchung des größeren, physiologischen Konversionsproduktes des Faktor B, Bb, zeigte, daß sich der Faktor B-Polymorphismus in seinem Bb-Fragment widerspiegelt (s. Abb. 5). Die Aminosäuresubstitution, die zu der beobachteten Ladungsdifferenz zwischen Bf-F und Bf-S geführt hat, mußte folglich auf dem Bb-Fragment des Faktor B stattgefunden haben. Beim Menschen scheinen aber gerade die Ladungsunterschiede der beiden häufigsten Varianten Bf-F und Bf-S nicht im Bb, sondern im kleineren Ba-Fragment lokalisiert zu sein, da die größeren Spaltprodukte von Bf-F und Bf-S in der Elektrophorese ununterscheidbar die gleiche Position einnehmen (6).

Beim Rhesusaffen liegt die für die Ladungsdifferenz von Bf-F und Bf-S verantwortliche Aminosäuresubstitution offensichtlich wie beim Meerschweinchen im Bb-Fragment (125). Die zu den häufigsten Allelen führenden Mutationen betrafen in diesen drei Spezies also sowohl das Bb- als auch das Ba-Fragment.

Als in dieser Arbeit das C4 des Meerschweinchens untersucht wurde, war in der Literatur noch kein genetisch determinierter Polymorphismus von C4 in einer Spezies bekannt. Zwar konnten elektrophoretische

Heterogenitäten des humanen C4 demonstriert werden; ein diesen Heterogenitäten zugrundeliegendes formalgenetisches Modell wurde jedoch nicht gefunden (12, 104). Da das C4-Molekül aus drei Polypeptidketten besteht (110), nahm man an, daß mindestens zwei Gene für die Variabilität des humanen C4 verantwortlich seien (12, 104). Bei der elektrophoretischen Untersuchung des C4 des Meerschweinchens wurden jedoch bei der Verwendung von Plasmaproben diskrete, polymorphe Bandenmuster erzielt (s. Abb. 7), die offenbar von drei Allelen eines einzigen C4-Strukturgen determiniert werden. Serumproben ergaben dagegen nur verwaschene Bandenmuster, die nicht zu interpretieren waren. Die Unterschiede zwischen Serum- und Plasmaproben konnten jedoch dadurch erklärt werden, daß bei der Gewinnung von Serumproben das C4 während der Blutgerinnung teilweise aktiviert und in seine Fragmente gespalten wird (s. Abb. 6). Diese Befunde wurden in einer kürzlich erschienenen Publikation von Teisberg et al. (120), bestätigt. Die Autoren erhielten auch mit Plasmaproben polymorphe Bandenmuster des humanen C4, deren Vererbung wie beim Meerschweinchen für ein einziges, autosomales C4-Strukturgen sprach.

Beim Meerschweinchen wurden sechs C4-Phänotypen beobachtet (s. Abb. 7), die auf drei Varianten des C4-Moleküls zurückgeführt werden konnten. Der Phänotyp eines Homozygoten bestand aus einer Haupt- und einer Minorbande, der Phänotyp Heterozygoter entsprach der einfachen Kombination der entsprechenden Bilder Homozygoter. Das Segregationsmuster sprach für ein autosomales C4-Strukturgen mit drei Allelen $C4^F$, $C4^S$ und $C4^{S1}$. Auch die Tatsache, daß der Phänotyp $C4^{FSS1}$ nicht gefunden wurde, deutete daraufhin, daß wie beim Menschen nur ein Strukturgen den C4-Polymorphismus determiniert. Für die Richtigkeit dieser Schlußfolgerung spricht auch eine kürzlich erschienene Arbeit von Hall und Colten (52): In einem System der zellfreien Proteinsynthese konnten sie demonstrieren, daß an den Ribosomen das C4 aus nur einer Polypeptidkette gebildet wird. Durch eine nachträgliche Spaltung dieser Polypeptidkette entstehen erst die drei Ketten des zirkulierenden Serum C4. Da im allgemeinen ein Gen eine Polypeptidkette kodiert, darf man annehmen, daß das gesamte C4-Molekül von nur einem einzigen Strukturgen kodiert wird.

2. Der C4-Defekt des Meerschweinchens

Unter diesem Aspekt stellte sich nun die Frage, in welcher Beziehung der bekannte C4-Defekt des Meerschweinchens zu dem Polymorphismus des C4-Strukturgens steht. Die C4-Defizienz des Meerschweinchens wird autosomal rezessiv vererbt (34) und soll nach Colten und Parkman auf einem Defekt des Strukturgens beruhen (24). Wenn nur ein Strukturgen das C4-Molekül kodiert, müßte der C4-Defekt ein "stummes" Allel des C4-Strukturgens sein und sich dementsprechend in der Elektrophorese phänotypisch nachweisen lassen. Tatsächlich zeigten homozygot C4-defekte Meerschweinchen keine Bandenmuster, und heterozygot C4-defekte Meerschweinchen zeigten jeweils nur ein Paar von Haupt- und Minorbanden, welches sich immer einem der drei Allele $C4^F$, $C4^S$ oder $C4^{S1}$ zuordnen ließ (s. Abb. 9). Die Nachkommen von Kreuzungen C4-defekter Tiere mit Meerschweinchen des Genotyps $C4^{SS1}$ erbten entweder $C4^S$ oder $C4^{S1}$, nie beide Allele zusammen. Die Intensität des Bandenpaares heterozygot C4-defekter Meerschweinchen entsprach der eines der beiden Bandenpaare "normal" heterozygoter Meerschweinchen. Während als Ursache für den C4-Defekt des Menschen noch ein Defekt des Regulatorgens diskutiert wird (62), kommt dies nach den genannten Befunden für den C4-Defekt des Meerschweinchens aus folgenden Gründen nicht in Betracht:

1. Bei einem Regulatorgendefekt müßten sich in Heterozygoten die Strukturgenprodukte beider Chromosomen nachweisen lassen. Heterozygot C4-defekte Meerschweinchen mit zwei C4-Varianten wurden jedoch nicht beobachtet; sie besaßen offensichtlich immer nur ein einziges Bandenpaar als phänotypischen Ausdruck für die Aktivität nur eines der beiden Strukturgene.

2. Die volle Expression eines der beiden Allele in heterozygot C4-defekten Meerschweinchen zeugte für ein intaktes Regulationssystem der C4 Produktion von der Synthese innerhalb der Zelle bis zur Sekretion ins Plasma. Offen blieb jedoch noch die Möglichkeit eines Operatorgendefekts, der erwartungsgemäß nur die Aktivität des damit verbundenen Strukturgens auf demselben Chromosom und nicht auf dem homologen beeinflussen würde. Bei homozygot C4-defekten Meerschweinchen und einem homozygot C4-defekten Patienten wurde aber C4 in der Zelle bzw.

auf der Zelloberfläche antigenetisch nachgewiesen (53, 62). Das bedeutet, daß auch in Zellen homozygot C4-defekter Individuen C4 oder C4 ähnliche Moleküle synthetisiert werden und das Operatorgen folglich intakt sein muß. Danach bietet sich folgendes, allen Befunden gerecht werdendes Modell des C4-Defekts an: Sowohl beim Menschen als auch beim Meerschweinchen wird in den C4 synthetisierenden Zellen eine defekte Polypeptidkette gebildet. Der Mangel an zirkulierendem C4 kommt dadurch zustande, daß die proteolytische Spaltung des defekten Genprodukts ausbleibt und die Zellen nicht mehr in der Lage sind, das geschädigte C4-Molekül zu sezernieren. Das defekte C4-Strukturgen, C4⁰, kodiert demnach eine vierte, aber defekte Variante des C4-Moleküls und wird vor allem wegen seines allelen Verhaltens zu C4^F, C4^S und C4^{S1} als viertes, seltenes Allel des C4-Polymorphismus betrachtet.

3. Kopplungsungleichgewichte von Bf- und C4-Haplotypen

Die Polymorphismen von Bf und C4 ermöglichten es, den Erbgang beider Loci zu verfolgen und deren Kopplungsbeziehungen zu bestimmen. In allen untersuchten Familien segregierten die Bf- und C4-Varianten gemeinsam, Rekombinationen wurden nicht entdeckt. Die Loci Bf und C4 liegen folglich auf demselben Chromosom. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Verhältnissen beim Menschen, bei dem, wie sich parallel zu dieser Arbeit herausstellte, C4 und Bf auch gemeinsam auf einem Chromosom, dem Chromosom Nr. 6, liegen (2, 120). In einer 175 Tiere umfassenden Populationsstichprobe wurde zudem ein ausgeprägtes Kopplungsungleichgewicht der Bf und C4 Allele entdeckt. Bf^F war stets mit C4^S oder C4^{S1} assoziiert, Bf^S stets mit C4^F (s. Tab. 4). Eine derart strenge Assoziation einzelner Allele ist nur möglich, wenn die beiden Loci Bf und C4 so dicht benachbart auf dem Chromosom liegen, daß Crossing-over nicht oder nur extrem selten diese Assoziationen durchbrechen können.

Es blieb nun noch die Frage zu klären, mit welchem Bf Allel das C4⁰ als viertes Allel des polymorphen C4 Locus assoziiert ist. In der Auszuchtpopulation wurden keine homo- oder heterozygot C4-defekten

Meerschweinchen entdeckt. Aufschluß gab jedoch der C4-defekte Stamm, dessen Tiere alle den gleichen Bf-Genotyp Bf^{SS} hatten. Aus Kreuzungen dieses Stammes mit Meerschweinchen des Genotyps Bf^{FF} ging hervor, daß das $C4^0$ Allel immer zusammen mit dem Bf^S Allel segregierte und mit diesem assoziiert auftrat. $C4^0$ entspricht insofern dem $C4^F$ und es liegt die Vermutung nahe, daß $C4^0$ durch eine Mutation des $C4^F$ Allels entstanden ist.

4. Die Position der Loci Bf und C4 im GPLA-System

Der Allelismus des C4-Defekts mit $C4^F$, $C4^S$ und $C4^{S1}$ und dessen Kopplung mit Bf implizierte bereits die Kopplung der Bf- und C4-Strukturgene mit dem GPLA. Shevach stellte nämlich fest, daß der C4-Defekt mit dem GPLA gekoppelt und darüberhinaus mit bestimmten GPLA-Antigenen assoziiert ist (114). Um festzustellen, ob auch die anderen C4 Allele mit bestimmten GPLA-Antigenen assoziiert sind, wurden jeweils mehrere Tiere der verfügbaren Inzuchtstämme mit bekanntem GPLA-Antigenmuster auch für Bf und C4 typisiert. Spezifische Assoziationen wurden dabei jedoch nicht beobachtet (s. Tab. 5). $C4^{S1}$ trat zwar nur in Verbindung mit GPLA-B.3 auf; eine solche generelle Assoziation müßte jedoch noch durch die Typisierung von ausgezüchteten Meerschweinchen verifiziert werden.

Die Bf- und C4-Homozygotie korrelierte erwartungsgemäß mit der Histokompatibilität der einzelnen Stämme. Die über viele Generationen ingezüchteten Stämme hatten in der Regel einheitliche Bf- und C4-Genotypen, während die noch nicht histokompatiblen Stämme heterogen bezüglich ihrer Bf- und C4-Genotypen waren. Diese Korrelation bewies allerdings nicht die Kopplung von C4 und Bf mit dem GPLA-System, da bei fortschreitender Inzuchtung die Homozygotie aller Loci des Genoms zunimmt.

Um einen direkten Beweis für die Kopplung von Bf und C4 mit dem GPLA-System zu erhalten, wurde die Vererbung der Bf-, C4- und GPLA-Phänotypen studiert. In den entsprechenden Familienstudien segre-

gierten die Bf, C4 und GPLA Allele gemeinsam (s. Abb. 12). Damit war die Kopplung der Bf- und C4-Strukturgene mit dem GPLA bewiesen. Dieses Ergebnis stimmte überein mit analogen Befunden bei den Spezies Mensch, Maus und Rhesusaffe, die teilweise schon zu Beginn dieser Arbeit bekannt waren, teilweise aber auch erst parallel zu dieser Arbeit erhoben wurden. Im Komplementsystem des Menschen wurden darüberhinaus noch eine Reihe anderer Polymorphismen und genetischer Defekte entdeckt, die über die Kopplungsbeziehungen weiterer Komplementkomponenten Aufschluß gaben, so daß gegenwärtig von fast allen Komponenten des Komplementsystems die Kopplungsbeziehung bezüglich des MHC bekannt sind. Eine Zusammenfassung der heute verfügbaren Daten über Defekte und Polymorphismen im Komplementsystem verschiedener Spezies sowie deren Kopplungsbeziehungen zum MHC zeigt Tab. 6. Wie aus der Tabelle hervorgeht, sind nur die Strukturgene für C4, C2 und Faktor B mit dem humanen MHC gekoppelt (2, 10, 42, 82, 100, 120), nicht aber die Komponenten der terminalen Komplementsequenz C3, C6, C7 und C8 (8, 29, 60, 102). Mit den in dieser Arbeit erhobenen Befunden weisen die Daten bei den Spezies Rhesusaffe, Maus und Meerschweinchen daraufhin, daß nur homologe Faktoren des klassischen und des alternativen Weges der Komplementaktivierung mit dem MHC gekoppelt sind.

Tabelle 6:

Komplementfaktoren	Kopplung mit MHC	Literatur
Mensch		
C1r-Defekt	-	27, 85
C4-Polymorphismus, -Defekt	+	58, 92, 100, 120
C2-Polymorphismus, -Defekt	+	10, 42, 44, 82
C3-Polymorphismus, -Defekt	-	3, 8, 9
C5-Funktionsstörung	?	105
C6-Polymorphismus, -Defekt	-	60, 85
C7-Defekt	-	102
C8-Defekt	-	29
Faktor B-Polymorphismus	+	2, 6, 98, 101
C1 INH-Defekt	-	7, 8
C3b INA-Defekt	-	9
Rhesusaffe		
C3-Polymorphismus	-	5, 126
Faktor B-Polymorphismus	+	125, 126
Maus		
C4=Ss-Protein	+	25, 74, 81
C3-Serumkonzentration/ Polymorphismus	(+)	38, 39, 96
C5-Defekt	-	23, 35, 59, 90
Meerschweinchen		
C4-Polymorphismus, -Defekt	+	19, 72, 73, 114
Faktor B-Polymorphismus	+	19, 72

Da beim Meerschweinchen die Befunde dafür sprechen, daß Bf und C4 sehr eng gekoppelt sind und eine der H-2S Region analoge Region repräsentieren, wurde dieser Abschnitt als Cp Region (Complement proteins) bezeichnet. Die Bezeichnung "S" war nicht möglich, da bereits eine Region des GPLA-Systems so benannt war (45); außerdem wurde dadurch einer Verwechslung mit dem HLA-C Locus des Menschen vorgebeugt.

Beim Menschen und bei der Maus sind aber nicht nur die Kopplungsbeziehungen einzelner Komplementkomponenten bekannt. Die Struktur sowohl des HLA-Systems als auch des H-2 Komplexes ist so gut charakterisiert, daß darüberhinaus eine genauere Lokalisation der die Komplementkomponenten kodierenden Gene möglich ist. Beim Meerschweinchen existieren jedoch nur vage Vorstellung über die Struktur des GPLA-Systems, da bisher formalgenetische Beweise wie z.B. Crossing-over fehlten, die auf eine bestimmte lineare Anordnung der drei bekannten GPLA-Regionen B, S und I hindeuteten (47). An zwei Crossing-over Familien aus dieser Arbeit zeigte sich aber, daß Bf und C4 als zusätzliche genetische Marker die Aussichten verbessern, GPLA-Rekombinationen zu entdecken. In der einen Familie führte das Crossing-over zu einer Rekombination der GPLA-B Allele mit den Bf und C4 Allelen (s. Abb. 13). Die Ia-Antigene waren in dieser Familie nicht informativ. In der anderen Familie (s. Abb. 14) ließ sich auch der Erbgang der Ia-Antigene verfolgen. Es zeigte sich, daß die Bf und C4 Allele zusammen mit den Ia-Antigenen segregierten und folglich eine Rekombination zwischen den Loci Bf, C4 und Ia einerseits und der B Region andererseits stattgefunden haben muß. Daraus folgt, daß die GPLA-B Region außerhalb der I und Cp Regionen liegt. Ob sich die Cp Region zwischen oder außerhalb der I und Cp Region befindet, können erst weitere Crossing-over Familien entscheiden. Die dem gegenwärtigen Wissensstand entsprechende GPLA-Struktur ist in Abb. 15 den Modellen des H-2 Komplexes und des HLA-Systems gegenübergestellt.

Vergleichende Übersicht der HLA-, H-2- und GPLA-Modelle

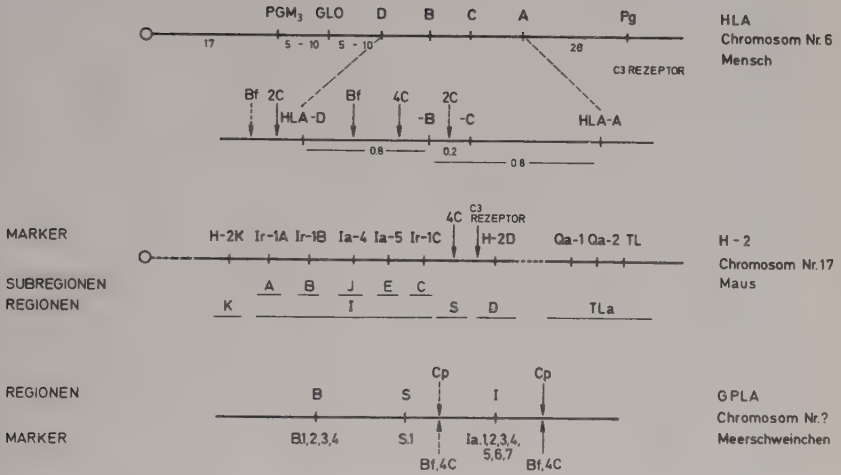


Abb. 15: Um eine Verwechslung mit den HLA-B und -C Loci zu vermeiden, erfolgte hier die Bezeichnung der Loci von Komplementkomponenten (4C für den Locus von C4, 2C für den Locus von C2 und Bf für den Locus von Faktor B) nach der Empfehlung des Complement Nomenclature Committee vom 7. International Complement Workshop, St. Petersburg Beach, Florida, USA 1977. Die Mehrfachlokalisation der Loci Bf und 4C im HLA-System beruht auf den entsprechend unterschiedlichen Befunden der jeweiligen Autoren (92, 98, 100, 101). Die hypothetische Struktur des GPLA-Systems wurde von Geczy und de Weck übernommen (47). Nach den Befunden in dieser Arbeit kann die Cp Region sowohl zwischen als auch außerhalb der B und Ia Regionen liegen.

5. Die Rolle von Komplementkomponenten bei zellulären Immunmechanismen

Die Kenntnis der genetischen Organisation des GPLA-Systems ist von großem heuristischen Wert für die Immunbiologie. Sie ist eine Voraussetzung für die Analyse der Struktur-Funktionsbeziehungen eines Systems, dessen Gene neben den zellulären Immunmechanismen auch Komponenten der klassischen und alternativen Aktivierung des Komplementsystems determinieren. Dies scheint ein allgemeines Prinzip in höheren Vertebraten zu sein, da bei den vier Spezies Mensch, Maus, Rhesusaffe und Meerschweinchen jeweils einer oder mehrere der Faktoren C4, C2 und Faktor B mit dem MHC gekoppelt sind. C4, C2 und der Faktor B gehören demzufolge mit den Ia-Antigenen und den als Transplantationsantigenen bezeichneten Zelloberflächenproteinen zu den serologisch erfaßbaren Genprodukten eines MHC. Während die Wirkungsweise der Zelloberflächenproteine bei zellulären Immunreaktionen noch weitgehend unbekannt ist, sind C4, C2 und Faktor B proteinchemisch und zumindest innerhalb des Komplementsystems auch funktionell gründlich charakterisiert. In Anbetracht der genetischen Kopplung dieser Faktoren mit dem MHC stellt sich die Frage, ob diesen Faktoren oder ihren Fragmenten neben ihrer klar umschriebenen Funktion im Komplementsystem, nämlich C3 zu aktivieren, noch weitere Funktionen zukommen, die mit denen von anderen serologisch definierten Genprodukten des MHC verwandt sind. Während jedoch über derartige Funktionen der MHC-gekoppelten Komponenten C4, C2 und Faktor B bisher nur vage Vorstellungen bestehen (40), scheint deren gemeinsames Substrat, C3, nach der Spaltung in C3b und C3a in vielfältiger Weise mit zellulären Reaktionspartnern zu kooperieren. So ist C3b notwendig bei der Lokalisation von T-Zell-abhängigen Antigenen in den Keimzentren von Lymphknoten und Milz (32, 33, 93); es spielt eine Rolle bei der Kooperation von B-Zellen mit T-Zellen und Makrophagen (97) und trägt bei zur ungestörten Entwicklung von sogenannten Gedächtniszellen (67). Außerdem beeinflusst C3b die Aktivität von B-Lymphozyten (57). Diese Wirkungen von C3b werden dabei durch einen korrespondierenden Rezeptor auf der Zellmembran übermittelt. Dieser C3b-Rezeptor scheint sowohl beim Menschen als auch bei der Maus mit dem MHC gekoppelt zu

sein (26, 48). Wie Sobel und Bokisch 1975 zeigten, besitzen humane Lymphozyten jedoch auch Rezeptoren für C1q und C4b (118). Diese Befunde lassen vermuten, daß neben C3b auch die MHC-gekoppelten Faktoren selbst eine Rolle bei zellulären Immunmechanismen spielen.

Für die Suche nach dem funktionellen Korrelat zu der genetischen Kopplung von Komplementkomponenten mit dem MHC eignen sich als Experimentaltiere Maus und Meerschweinchen in unterschiedlicher Weise. Bei der Maus ist bisher nur die Kopplung von C4 mit dem H-2 Komplex gesichert (25, 74, 81). Nach der Entdeckung des C3- und des Faktor B-Polymorphismus (96, 107) ist allerdings bald mit dem Nachweis der Kopplung bzw. Nichtkopplung dieser Komponenten mit dem H-2 Komplex zu rechnen. Da das Komplementsystem der Maus aber hämolytisch äußerst ineffizient und zur Zeit noch wenig erforscht ist, scheint diese Spezies weniger für funktionelle Studien geeignet zu sein. Dagegen sollte bei der umfangreich analysierten Struktur des H-2 Komplexes eine sehr genaue Lokalisation der Loci von Komplementkomponenten innerhalb dieses Systems möglich sein. Damit ergäben sich wichtige Hinweise für die Verhältnisse beim Menschen, wo die exakten Positionen der Loci Bf, C4 und C2 im HLA-System noch kontrovers beurteilt werden (s. Abb. 15).

Das GPLA-System des Meerschweinchens ist im Vergleich zum H-2 Komplex der Maus zwar weniger gut charakterisiert, in der letzten Zeit wurden aber zunehmend bessere zelluläre, immunologische Testsysteme entwickelt (46, 113, 114). Außerdem ist das Komplementsystem des Meerschweinchens fast ebenso gründlich analysiert wie das humane. Nachdem in dieser Arbeit die Kopplung von Bf und C4 mit dem GPLA-System nachgewiesen wurde, bietet sich das Meerschweinchen als Experimentalmode'll an für die Aufklärung der Interaktionsweise von Komplementkomponenten mit zellulären Reaktionspartnern bei MHC-kontrollierten Immunmechanismen.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Von den Faktoren des Komplementsystems wurden bei der Maus C3 und der Faktor B, beim Meerschweinchen C4, C3 und der Faktor B elektrophoretisch untersucht. Ein genetisch determinierter Polymorphismus wurde beim Faktor B und beim C4 des Meerschweinchens entdeckt. Der Polymorphismus des Faktor B beruht auf zwei häufigen, kodominanten Allelen eines autosomalen Strukturgens, Bf^F und Bf^S , mit Frequenzen von 0,624 und 0,376. Dem Polymorphismus des C4 liegt ein einziges autosomales Strukturgen zugrunde, für das drei häufige Allele $C4^F$, $C4^S$ und $C4^{S1}$ mit Frequenzen von 0,351, 0,403 und 0,246 existieren. $C4^0$, das für den C4-Defekt verantwortliche Gen, erwies sich als viertes, seltenes Allel.

In Familienstudien wurde die Kopplung der Loci Bf und C4 demonstriert. Darüberhinaus fand sich ein ausgeprägtes Kopplungsungleichgewicht. Es stellte sich heraus, daß Bf^F immer mit $C4^S$ oder $C4^{S1}$, Bf^S immer mit $C4^F$ oder $C4^0$ assoziiert waren. Diese Assoziationen wurden auch bei den typisierten Inzuchtstämmen beobachtet.

Es wurde nachgewiesen, daß Bf und C4 mit dem MHC des Meerschweinchens, dem GPLA-System, gekoppelt sind. Die Region, in der die Loci Bf und C4 lokalisiert sind, wurde Cp genannt. Eine der beiden entdeckten GPLA-Rekombinationen deutete daraufhin, daß die GPLA-B Region außerhalb der I und Cp Regionen liegt. Mit der Bf- und C4-Typisierung konnte die GPLA Region verschiedener Inzuchtstämmen näher charakterisiert werden. Damit wurden die Voraussetzungen geschaffen, um die Beziehungen zwischen den Funktionen und der Struktur des GPLA-Systems analysieren zu können.

Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde bereits publiziert:

1. Bitter-Suermann, D., Krönke, M., Brade, V., and Hadding, U.:
Inherited polymorphism of guinea pig factor B and C4: Evidence
for genetic linkage between the C4 and Bf loci.
J. Immunol. 118, 1822 (1977)
2. Krönke, M., Hadding, U., Geczy, A.F., de Weck, A.L., and
Bitter-Suermann, D.:
Linkage of guinea pig Bf and C4 to the GPLA.
J. Immunol. 119, 2016 (1977)
3. Krönke, M., Geczy, A.F., Hadding, U., and Bitter-Suermann, D.:
Linkage of C4 and C4 deficiency to Bf and GPLA.
Immunogenetics 5, 461 (1977)

G. LITERATURVERZEICHNIS

1. AGARWAL, D.P., BENKMANN, H.G., and GOEDDE, H.W.:
Genetic polymorphism of the third component of complement (C3)
and levels of $\beta 1C/\beta 1A$ -globulin in sera of German and Spanish
populations.
Hum. Hered. 22, 356 (1972)
2. ALLEN, F.H., Jr.:
Linkage of HL-A and GBG.
Vox Sang. 27, 382 (1974)
3. ALPER, C.A. and PROPP, R.P.:
Genetic polymorphism of the third component of human complement
(C3).
J. Clin. Invest. 47, 2181 (1968)
4. ALPER, C.A. and JOHNSON, A.M.:
Immunofixation electrophoresis: A technique for the study of
protein polymorphism.
Vox Sang. 17, 445 (1969)
5. ALPER, C.A., ROBIN, N.J., and REFETOFF, S.:
Genetic polymorphism in Rhesus C3 and Gc globulin.
J. Immunology 107, 96 (1971)
6. ALPER, C.A., BOENISCH, T., and WATSON, L.:
Genetic polymorphism in human glycine-rich beta-glycoprotein.
J. Exp. Med. 135, 68 (1972)
7. ALPER, C.A. and ROSEN, F.S.:
Genetic considerations.
In: Biological Activities of Complement.
pp. 260-274, Basel: Karger 1972

8. ALPER, C.A. and ROSEN, F.S.:
The role of complement in vivo as revealed by genetic defects.
In: Brent, L., Holborow, J. (Eds.)
Progress in Immunology II
North Holland Publ. Comp. 1974. Vol. 1
9. ALPER, C.A. and ROSEN, F.S.:
Genetics of the complement system.
In: Harris, H. and Hirschhorn, K. (Eds.)
Advances in Human Genetics.
Plenum Publ. Corp., New York 1976
10. ALPER, C.A.:
Inherited structural polymorphism in human C2: evidence for
genetic linkage between C2 and Bf.
J. Exp. Med. 144, 1111 (1976)
11. ALPER, C.A. and BALAVITCH, G.:
Evidence that cobra venom factor (CoF) is cobra C3.
J. Immunol. 116, 1727 (1976)
12. BACH, S., RUDDY, S., MacLAAREN, J.A., and AUSTEN, K.F.:
Electrophoretic polymorphism of the fourth component of human
complement (C4) in paired maternal and foetal plasmas.
Immunology 21, 869 (1971)
13. BENACERRAF, B. and McDEVITT, H.O.:
Histocompatibility-linked immune response genes.
Science 175, 273 (1972)
14. BITTER-SUERMAN, D., HADDING, U., MELCHERT, F., and WELLENSIEK, H.:
Independent and consecutive action of the complement components
C5, C6 and C7 in immune hemolysis.
I. Preparation of EAC1-5 with purified guinea pig C3 and C5.
Immunochemistry 7, 955 (1970)

15. BITTER-SUERMAN, D., DIERICH, M., KÖNIG, W., and HADDING, U.:
Bypass activation of the complement system starting with C3.
I. Generation and function of an enzyme from a factor of guinea pig serum and cobra venom.
Immunology 23, 267 (1972)
16. BITTER-SUERMAN, D., HADDING, U., SCHORLEMMER, H.U., LIMBERT, M., DIERICH, M., and DUKOR, P.:
Activation by some T-independent antigens and B cell mitogens of the alternative pathway of the complement system.
J. Immunol. 115, 425 (1975)
17. BITTER-SUERMAN, D., BURGER, R., BRADE, V., and HADDING, U.:
Mouse factor B of the alternative pathway of complement activation.
I. Purification, characterization, and functional behavior.
J. Immunol. 117, 1799 (1976)
18. BITTER-SUERMAN, D., JAETH, H., BRADE, V., KOSSOROTOW, A., and HADDING, U.:
C5-activation by enzymes of the alternative pathway of the complement system. The reaction of a C3-cleaving cobra-factor-B-enzyme (VF-B) with guinea pig C5.
J. Immunol. 116, 1128 (1976)
19. BITTER-SUERMAN, D., KRÖNKE, M., BRADE, V., and HADDING, U.:
Inherited polymorphism of guinea pig factor B and C4: evidence for genetic linkage between the C4 and Bf loci.
J. Immunol. 118, 1822 (1977)
20. BODMER, W.:
Evolutionary significance of the HL-A system.
Nature (London) 237, 139 (1972)
21. BOKISCH, V.A., DIERICH, M.P., and MÖLLER-EBERHARD, H.J.:
Third component of complement (C3): Structural properties in relation to functions.
Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 1989 (1975)

22. BRADE, V., COOK, C.T., SHIN, H.S., MAYER, M.M.:
Studies on the properdin system: isolation of a heatlabile factor from guinea pig serum related to a human glycine-rich beta-glycoprotein (GBG or factor B).
J. Immunol. 109, 1174 (1972)
23. CINADER, B., DUBISKI, S., and WARDLAW, A.C.:
Distribution, inheritance, and properties of an antigen, MuBI, and its relation to hemolytic complement.
J. Exp. Med. 120, 897 (1964)
24. COLTEN, H.R. and PARKMAN, R.:
Biosynthesis of C4 (fourth component of complement by hybrids of C4-deficient guinea pig cells and HeLa cells.
Science 176, 1029 (1972)
25. CURMAN, B., ØSTERBERG, L., SANDBERG, L., MALHEDEN-ERIKSON, I., STÅLENBERG, I., RASK, G., and PETERSON, D.A.:
H-2 linked Ss protein is C4 component of complement.
Nature 258, 243 (1975)
26. CURRY, R.A., DIERICH, M.P., PELLEGRINO, M.A., and HOCH, J.A.:
Evidence for linkage between HLA antigens and receptors for complement components C3b and C3d in human-mouse hybrids.
Immunogenetics 3, 465 (1976)
27. DAVIS, A.E., ROSENBERG, R.D., FENTON, J.W., BING, D.H., ROSEN, F.S., and ALPER, C.A.:
Is factor D of the alternative pathway a fragment of Thrombin?
J. Immunol. 1978, in press.
28. DAY, N.K., RUBINSTEIN, P., deBRACCO, M., MOCADA, B., HANSEN, J.A., DUPONT, B., THOMSEN, M., SVEJGARD, A., and JERSILD, C.:
Hereditary C1r deficiency. Lack of linkage to the HLA region in two families.
In: Kissmeyer-Nielsen, F. (Ed.), Histocompatibility Testing, Munksgaard, Copenhagen 1975

29. DAY, N.K., DEGOS, L., BETH, E., SASPORTES, M., GHARBI, R.,
and GIRALDO, G.:
C8 deficiency in a family with Xeroderma pigmentosum. Lack of
linkage to the HLA region.
(Abstr.) Congress "HLA and Disease", Paris 1976
30. DÉMANT, P., CAPKOVA, J., HINZOVA, E., and VORACOVA, B.:
The role of histocompatibility-2-linked Ss-Slp region in the
control of mouse complement.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 863 (1973)
31. DIERICH, M.P. and BOKISCH, V.A.:
Receptor binding sites on C3 and C3b.
J. Immunol. 118, 2145 (1977)
32. DIETRICH, F.M., MITCHELL, G.F., BITTER-SUERMAN, D., and
DUKOR, P.:
Complement dependence of antigen-localization in lymphoid tissue.
(Abstr.) Joint Meeting of European Societies of Immunology 1973
33. DUKOR, P., DIETRICH, F.M., GISLER, R.H., SCHUMANN, G., and
BITTER-SUERMAN, D.:
Possible targets of complement action in B-cell triggering.
In: Brent, L. and Holborow, J. (Eds.), Progress in Immunology II
North-Holland Publ. Comp. 1974. Vol. 3
34. ELLMAN, L., GREEN, I., and FRANK, M.M.:
Genetically controlled total deficiency of the fourth component
of complement in the guinea pig.
Science 170, 74 (1970)
35. ERICKSON, R.P., TACHIBANA, D.K., HERZENBERG, L.A., and ROSENBERG, L.T.:
A single gene controlling hemolytic complement and a serum
antigen in the mouse.
J. Exp. Med. 120, 897 (1964)

36. FEARON, D.T. and AUSTEN, K.F.:
Activation of the alternative complement pathway with rabbit erythrocytes by circumvention of the regulatory action of endogenous control proteins.
J. Exp. Med. 146, 22 (1977)
37. FEARON, D.T. and AUSTEN, K.F.:
Activation of the alternative complement pathway due to resistance of zymosan-bound amplification convertase to endogenous regulatory mechanisms.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1683 (1977)
38. FERREIRA, A. and NUSSENZWEIG, V.:
Genetic linkage between serum levels of the third component of complement and the H-2 complex.
J. Exp. Med. 141, 513 (1975)
39. FERREIRA, A. and NUSSENZWEIG, V.:
Control of C3 levels in mice during ontogeny of a gene in the control region of the H-2 complex.
Nature 260, 613 (1976)
40. FERRONE, S., PELLEGRINO, M.A., and COOPER, N.R.:
Expression of C4 on human lymphoid cells and possible involvement in immune recognition phenomena.
Science 193, 53 (1976)
41. FESTING, M.:
Inbred strains of guinea-pigs.
Guinea pig Newslett 4, 3 (1971)
42. FU, S.M., KUNKEL, H.G., BRUSMAN, H.P., ALLEN, F.H., and FOTINO, M.:
Evidence for linkage between HL-A histocompatibility genes and those involved in the synthesis of the second component of complement.
J. Exp. Med. 140, 1108 (1974)

43. FRELINGER, J.A. and SHREFFLER, D.C.:
The Major Histocompatibility Complex.
In: Benacerraf, B. (Ed.), Immunogenetics and Immunodeficiency
St. Leönhard's House, Lancaster, England 1975
44. FRIEND, P., KIM, Y., HANDWERGER, B., REINSMOEN, N., MICHAEL, A.,
and YUNIS, E.:
C2 deficiency in man. Relationship including propable genetic
mapping, to the mixed lymphocyte reaction stimulator (S or LD)
determinant short 7a.
In: Kissmeyer-Nielsen, F. (Ed.), Histocompatibility Testing.
Munksgaard, Kopenhagen 1975
45. GECZY, A.F., deWECK, A.L., SCHWARTZ, B.D., and SHEVACH, E.M.:
The major histocompatibility complex of the guinea pig.
I. Serologic and genetic studies.
J. Immunol. 115, 1704 (1975)
46. GECZY, A.F. and deWECK, A.L.:
The major histocompatibility complex of the guinea pig.
II. Relationship between mixed leucocyte reactivity and sero-
logically-defined phenotypes of the GPLA B-locus and I-region.
Immunogenetics 3, 191 (1976)
47. GECZY, A.F. and deWECK, A.L.:
Molecular basis of T cell dependent genetic control of the immune
response in the guinea pig.
Prog. Allergy 22, 147 (1977)
48. GELFAND, M.C., SACHS, D.H., LIEBERMANN, R., and PAUL, W.E.:
Ontogeny of B lymphocytes.
III. H-2 linkage of a gene controlling the rate of appearance
of complement receptor lymphocytes.
J. Exp. Med. 139, 1142 (1974)

49. GÖTZE, D. and MÖLLER-EBERHARD, H.J.:
The alternative pathway of complement activation.
Advances in Immunology 24, 1 (1976)
50. GREBE, S.C. and STREILEIN, J.W.:
Graft-versus-host reactions: A review.
Adv. Immunol. 22, 120 (1976)
51. GYÖNGYÖSSY, M.I.C. and ASSIMEH, S.N.:
Isolation of the third component of mouse complement.
J. Immunol. 118, 1032 (1977)
52. HALL, R.E. and COLTEN, H.R.:
Cell free biosynthesis of the fourth component of complement
of guinea pig complement (C4).
Fed. Proc. 36, 1209 (1977)
53. HALL, R.E. and COLTEN, H.R.:
Genetic deficiency of the fourth component of complement defective
translation of the fourth component of complement messenger
ribonuclein acid.
Clin. Res. 25, 483 (1977)
54. HARRINGTON, J.C., FENTON, J.W., II., and PERT, J.H.:
Polymer-induced precipitation of antigen-antibody complexes:
"precipiplex" reactions.
Immunochemistry 8, 413 (1971)
55. HARRIS, H. and HOPKINSON, D.A.:
Average heterozygosity per locus in man: an estimate based on
the incidence of enzyme polymorphism.
Ann. Hum. Genet. London 36, 9 (1972)
56. HARRIS, H.
Molecular evolution: the neutralist-selectionist controversy.
Fed. Proc. 35, 2079 (1976)

57. HARTMANN, K.U. and BOKISCH, V.A.:
Stimulation of murine B lymphocytes by isolated C3b.
J. Exp. Med. 142, 600 (1975)
58. HAUPTMANN, G., GROSSHANS, E., HEID, E.:
Lupus érythémateux aigue et déficit héréditaire en complément.
A propos d' un cas par déficit complet en C4.
Ann. Derm. Syph. (Paris) 101, 479 (1974)
59. HERZENBERG, L.A., RACHIBANA, D.K., HERZENBERG, L.A., and
ROSENBERG, L.T.:
A gene locus concerned with hemolytic complement in *Mus musculus*.
Genetics 48, 711 (1963)
60. HOBART, M.J., LACHMANN, P.J., and ALPER, C.A.:
Polymorphism of human C6.
In: Peeters, H. (Ed.), Protides of the Biological Fluids 22,
575 (1975)
61. ITANO, H.A. and ROBINSON, E.A.:
Genetic control of the α -chain and β -chains of hemoglobin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46, 613 (1960)
62. JACKSON, C.G., OCHS, H.D., and WEDGWOOD, R.J.:
Lymphocyte bound fourth component of complement (C4) in a
patient lacking serum C4.
Fed. Proc. 36, 3 1208 (1977)
63. KABAT, E.A. and MAYER, M.M.:
.Experimental Immunochemistry.
C. Thomas, Springfield, USA 1971, 2. Auflage
64. KATZ, D.H. and BENCERRAF, B.:
The function and interrelationships of T-cell receptors, Ir
genes and other histocompatibility gene products.
Transplant. Rev. 22, 175 (1975)

65. KIMURA, M. and OHTA, T.:
Protein polymorphism as a phase of molecular evolution.
Nature 229, 467 (1971)
66. KING, J.L. and JUKES, T.H.:
Non Darwinian evolution.
Science 164, 788 (1969)
67. KLAUS, G.G.B. and HUMPHREY, J.H.:
The generation of memory cells.
I. The role of C3 in the generation of B memory cells.
Immunology 33, 31 (1977)
68. KLEIN, J. and SHREFFLER, D.C.:
The H-2 model for the major histocompatibility systems.
Transplant. Rev. 6, 3 (1971)
69. KLEIN, J.:
Biology of the mouse Histocompatibility-2 complex: Principles
of immunogenetics applied to a single system.
New York: Springer Verlag, 1975
70. KLEIN, J.:
An attempt at an interpretation of the mouse H-2 complex.
In: Weigle, W.O. (Ed.), Contemporary topics in immunobiology.
New York and London: Plenum Press 1976. Vol. 5
71. KOLB, W.P., HAXBY, J.A., ARROYAVE, C.M., and MÜLLER-EBERHARD, H.J.:
Molecular analysis of the membrane attack mechanism of complement.
J. Exp. Med. 135, 549 (1972)
72. KRÖNKE, M., HADDING, U., GECZY, A.F., deWECK, A.L., and
BITTER-SUERMAN, D.:
Linkage of guinea pig Bf and C4 to the GLA.
J. Immunol. 119, 2016 (1977)

73. KRÜNKE, M., GECZY, A.F., HADDING, U., and BITTER-SUERMAN, D.:
Linkage of C4 and C4 deficiency to Bf and GPLA.
Immunogenetics 5, 461 (1977)
74. LACHMANN, P.J., GRENNAN, D., MARTIN, A., and DÉMANT, P.:
Identification of Ss protein as murine C4.
Nature 248, 242 (1975)
75. LAURELL, C.G., LAURELL, S., and SKOOG, N.:
Buffer composition in paper electrophoresis. Considerations on
its influence with special reference to the interaction between
small ions and proteins.
Clin. Chem. 2, 99 (1956)
76. LAURELL, C.G.:
Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in
agarose gel containing antibodies.
Anal. Biochem. 15, 45 (1966)
77. LIMBERT, M.:
Isolierung und antigenetische Charakterisierung der dritten
Komplementkomponente (C3) aus Meerschweinchenserum. Nachweis
von Spaltprodukten und deren biologische Bedeutung.
Dissertation, TH Darmstadt (1973)
78. LONAI, P. and McDEVITT, H.O.:
I-region genes are expressed on T- and B-lymphocytes. Studies
of the mixed lymphocyte reaction (MLR).
J. Exp. Med. 140, 1317 (1974)
79. MAYER, M.M.:
Mechanism of cytolysis by complement.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2954 (1972)

80. MEDICUS, R.G., SCHREIBER, R.D., GÖTZE, O., and MÖLLER-EBERHARD, H.J.:
A molecular concept of the properdin pathway.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 612 (1976)
81. MEO, T., KRASTEFF, T., and SHREFFLER, D.C.:
Immunochemical characterization of murine H-2 controlled Ss
protein through the identification of its human homologue as
the fourth component of complement.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4536 (1976)
82. MEO, T., ATKINSON, J.P., BERNOCO, M., BERNOCO, D., and CEPPELINI, R.:
Structural heterogeneity of C2 complement protein and its genetic
variants in man: A new polymorphism of the HLA region.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1672 (1977)
83. MEUER, S., BECKER, S., HADDING, U., and BITTER-SUERMAN, D.:
The anaphylatoxic peptide C3a of guinea pig complement.
Purification, physicochemical and antigenetic properties.
Z. Immun.-Forsch. 154, 135 (1978)
84. MISHU, M.K. and NANCE, W.E.:
Further evidence for close linkage of the Hb^β and Hb α loci in man.
J. Med. Genet. 6, 190 (1969)
85. MITTAL, K.K., WOLSKI, K.P., LIM, D., GEWURZ, A., GEWURZ, H.,
and SCHMID, F.R.:
Genetic independence between the HL-A system and deficits in the
first and sixth component of complement.
Tissue Antigens 7, 97 (1976)
86. MONN, E.:
Relation between red blood cell phosphoglucomutase isoenzymes
and age of cell population.
Scand. J. Haematol. 6, 1 (1969)

87. MÖLLER-EBERHARD, H.J. and GÖTZE, O.:
C3 proactivator and its mode of action.
J. Exp. Med. 135, 1003 (1972)
88. MÖLLER-EBERHARD, H.J.:
Complement.
Ann. Rev. Biochem. 44 697 (1975)
89. NELSON, R.A.:
The immune-adherence phenomenon. An immunologically specific
reaction between microorganisms and erythrocytes leading to
enhanced phagocytosis.
Science 118, 733 (1953)
90. NILSSON, U.R. and MÖLLER-EBERHARD, H.J.:
Deficiency of the fifth component of complement in mice with
an inherited complement defect.
J. Exp. Med. 125, 1 (1967)
91. OCHOA, S.:
Translation of the genetic message.
Naturwissenschaften 55, 505 (1968)
92. OCHS, H.D., ROSENFELD, S.I., THOMAS, E.D., GIBLETT, E.R.,
SCHALLER, J.G., GILLILAND, G.C., JACKSON, C.G., and WEDGWOOD, R.J.:
Linkage between the fourth component of complement (C4) and the
major histocompatibility loci.
Clin. Res. 24, 181 (1976)
93. PAPAMICHAIL, M., GUTIERREZ, C., EMBLING, P., JOHNSON, P.,
HOLBOROW, E.J., and PEPYS, M.B.:
Complement dependency of localization of aggregated IgG in
germinal centres.
Scan. J. Immunol. 4, 343 (1975)

94. PARKER, W.C. and BEARN, A.G.:
Haptoglobin and transferrin variation in humans and primates:
two new transferrins in Chinese and Japanese populations.
Ann. Hum. Genet. London 25, 227 (1961)
95. PARRINGTON, J.M., CRUICKSHANK, G., HOPKINSON, D.A., ROBSON, E.B.,
and HARRIS, H.:
Linkage relationships between the three phosphoglucomutase loci
PGM₁, PGM₂ and PGM₃.
Ann. Hum. Genet. London 32, 27 (1968)
96. PENALVA da SILVA, F., HOECKER, G.F., DAY, N.K., VIENNE, K., and
RUBINSTEIN, P.:
Murine complement component 3: Genetic variation and linkage to
H-2.
Proc. Nat. Acad. Sci. 75, 963 (1978)
97. PEPYS, M.B.:
Role of complement in the induction of immunological responses.
Transplant. Rev. 32, 93 (1976)
98. RAUM, D., GLASS, D., CARPENTER, C.B., ALPER, C.A., and SCHUR, D.H.:
The chromosomal order of genes controlling the major histocompa-
tibility complex, properdin factor B, and deficiency of the second
component of complement.
J. Clin. Invest. 58, 1240 (1976)
99. RITTNER, C. (Ed.):
First international Symposium and Workshop on the Polymorphism
of the Third Component of Human Complement System.
Vox Sang. 25, 9 (1973)
100. RITTNER, C., HAUPTMANN, G., GROSSE-WILDE, H., GROSSHANS, E.,
TONGIO, M.M., and MAYER, S.:
Linkage between HL-A (Major Histocompatibility Complex) and genes
controlling the synthesis of the fourth component of complement.
In: Kissmeyer-Nielsen, F. (Ed.), Munksgaard, Copenhagen (1975)

101. RITTNER, C., GROSSE-WILDE, H., and ALBERT, E.D.:
Localization of the Bf locus within the HLA region: Report on
an informative family and critical evaluation of available data
on Bf mapping.
Humangenetik 35, 79 (1976)
102. RITTNER, C., OPFERKUCH, W., WELLEK, B., GROSSE-WILDE, H.,
and WERNET, P.:
Lack of linkage between gene(s) controlling the synthesis of
the seventh component of complement and the HLA region on
chromosome No. 6 in man.
Human Genetics 4, 137 (1976)
103. RITTNER, C.:
Genetic loci of components of the classical and alternate
pathway of complement activation. A new dimension of the
immunogenetic linkage group (HLA) on chromosome No. 6 in man.
Humangenetik 35, 1 (1976)
104. ROSENFELD, S.I., RUDDY, S., and AUSTEN, K.F.:
Structural polymorphism of the fourth component of human
complement.
J. Clin. Invest. 48, 2238 (1969)
105. ROSENFELD, S.I. and LEDDY, J.P.:
Hereditary deficiency of fifth component (C5) in man.
J. Clin. Invest. 53, 67 (1974)
106. RUBINSTEIN, P. and FERREBEE, J.:
The H-2 phenotypes of random bred Swiss-Webster mice.
Transplantation 2, 715 (1964)
107. RUBINSTEIN, P., ROSENFELD-STEELE, P., and DAY, N.K.:
Murine factor B: electrophoretic polymorphism.
Immunogenetics 5, 363 (1977)

108. SACHS, L.:
Statistische Auswertungsmethoden.
Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1972 (3. Auflage)
109. SCHORLEMMER, H.U., BITTER-SUERMAN, D., and ALLISON, A.C.:
Complement activation by the alternative pathway and macrophage
enzyme secretion in the pathogenesis of chronic inflammation.
Immunology 32, 929 (1974)
110. SCHREIBER, R.D. and MÖLLER-EBERHARD, H.J.:
Fourth component of human complement. Description of a three
polypeptide chain structure.
J. Exp. Med. 140, 1324 (1974)
111. SCHREIBER, R.D., GÖTZE, O., and MÖLLER-EBERHARD, H.J.:
Alternative pathway of complement: Demonstration and character-
ization of Initiating Factor and its properdin-independent
function.
J. Exp. Med. 144, 1062 (1976)
112. SCHWARTZ, B.D., PAUL, W.E., and SHEVACH, E.M.:
Guinea pig Ia antigens. Functional significance and chemical
characterization.
Transplant. Rev. 30, 174 (1976)
113. SCHWARTZ, B.D., KASK, A.M., PAUL, W.E., GECZY, A.F., and
SHEVACH, E.M.:
The guinea pig I region. I. A structural and genetic analysis.
J. Exp. Med. 146, 547 (1977)
114. SHEVACH, E.M., FRANK, M.M., and GREEN, I.:
Linkage of the gene controlling the synthesis of the fourth
component of complement to the major histocompatibility
complex of the guinea pig.
Immunogenetics 3, 576 (1976)

115. SHEVACH, E.M., LUNDQUIST, M.L., GECZY, A.F., and SCHWARTZ, B.D.:
The guinea pig I region. II. Functional analysis.
J. Exp. Med. 146, 561 (1977)
116. SHREFFLER, D.C. and DAVID, C.S.:
The H-2 major histocompatibility complex and the I immune response region: Genetic variation, function, and organization.
Adv. Immunol. 20, 125 (1975)
117. SHREFFLER, D.C.:
The S region of the mouse major histocompatibility complex (H-2): Genetic variation and functional role in complement system.
Transplant. Rev. 32, 140 (1976)
118. SOBEL, A.T. and BOKISCH, V.A.:
Receptor for C4b and C1q on human peripheral lymphocytes and lymphoblastoid cells.
In: Seligmann, M., Preud'Homme, J.L., and Kourilsky, F.M. (Eds.)
Membrane receptors of lymphocytes.
North Holland Publ. Comp. Amsterdam-Oxford, American Elsevier Publ. Comp. Inc. New York 1975
119. TEISBERG, P.:
High voltage agarose gel electrophoresis in the study of C3 polymorphism.
Vox Sang. 19, 47 (1970)
120. TEISBERG, P., ÅKESSON, J., OLAISEN, B., GEDDE-DAHL, T., Jr., and THORSBY, E.:
Genetic polymorphism of C4 in man and localization of a structural C4 locus to the HLA gene complex of chromosome 6.
Nature 264, 253 (1976)
121. VOGT, W.:
Activation, activities and pharmacological active products of complement.
Pharmacological Reviews 26, 2 (1974)

122. VOGT, W., DIEMINGER, L., LYNEN, R., and SCHMIDT, G.:
Alternate pathway complement activation in human serum:
Formation and composition of the complex with cobra venom
factor that cleaves the third component of complement.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 335, 171 (1974)
123. WECK, A.L.de, GECZY, A.F., SATO, W., and MUELLER, E.:
Guinea pig histocompatibility antigens.
Transplantation 2, 225 (1976)
124. WEIR, D.M.:
Handbook of experimental immunology.
Blackwell Scientific Publications, Oxford 1973
125. ZIEGLER, J.B., WATSON, L., and ALPER, C.A.:
Genetic polymorphism of properdin factor B in the Rhesus:
Evidence for single subunit structure in primates.
J. Immunol. 114, 1649 (1975)
126. ZIEGLER, J.B. and ALPER, C.A.:
Properdin factor B and histocompatibility loci linked in the
Rhesus monkey.
Nature 254, 609 (1975)
127. ZOUROS, E.:
Electrophoretic variation in allelozymes related to function
or structure?
Nature 254, 446 (1975)

Herrn Prof. Dr. Ch. Rittner, Institut für gerichtliche Medizin der Universität Bonn, danke ich für die initiale technische Beratung.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. A.F. Geczy, ehemals Institut für klinische Immunologie der Universität Bern, Schweiz, jetzt Red Cross Transfusion Service, Sydney N.S.W., Australien, für die Durchführung der GPLA-Typisierung danken, der damit wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

LEBENS LAUF

Am 9. April 1953 wurde ich als Sohn des Regierungsdirektors Gerhard Krönke und seiner Ehefrau Franziska, geborene Gruber, in Marburg an der Lahn geboren.

Von 1960 bis 1964 besuchte ich die Elly-Heuss-Knapp Schule in Darmstadt. Nach dem vierten Grundschuljahr wechselte ich 1964 zur Georg-Büchner Schule in Darmstadt, wo ich 1972 das Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig des Gymnasiums erwarb.

Im Wintersemester 1972/73 begann ich mit dem Studium der Chemie an der TH Darmstadt. Im Sommersemester 1973 wechselte ich das Studienfach und nahm das Studium der Medizin an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz auf. Im März 1975 legte ich die Ärztliche Vorprüfung ab, im März 1976 den ersten Abschnitt und im März 1977 den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung. Zur Zeit befinde ich mich im "Praktischen Jahr" an den Städtischen Kliniken in Wiesbaden.

Meine Inauguraldissertation fertigte ich in der Zeit von Juli 1975 bis Dezember 1977 am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz (Direktor Prof. Dr. P. Klein) an.

Seit 1976 bin ich mit Gabriele Krönke, geborene Oehme, Industriekaufmann, verheiratet.

